



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

체육학석사 학위논문

유산소 운동과 고지방, 고설탕
식이 제한이 대사이상 쥐의 Nr4a3 와
Apelin 의 발현 및 대사지표의
개선에 미치는 영향

2019 년 8 월

서울대학교 대학원

체육교육과

이 지 현

유산소 운동과 고지방, 고설탕
식이 제한이 대사이상 쥐의 Nr4a3 와
Apelin 의 발현 및 대사지표의
개선에 미치는 영향

지도 교수 송 욱

이 논문을 체육학석사 학위논문으로 제출함
2019 년 8 월

서울대학교 대학원
체육교육과
이 지 현

이지현의 체육학석사 학위논문을 인준함
2019 년 8 월

위 원 장 _____ 김 연 수 _____ (인)

부위원장 _____ 문 효 열 _____ (인)

위 원 _____ 송 욱 _____ (인)

초 록

최근 제2형 당뇨, 심혈관 질환, 비만, 고혈압, 만성신부전, 대사증후군 등 다양한 만성질환이 전 연령층에서 증가하고 있는 실정이다. 특히, 대사증후군은 여러 질환이 복합적으로 나타나는 질병으로 다양한 질병의 주요한 원인이 되며 병증을 가지고 있는 인구도 점차 늘고 있는 실정이다. 이러한 대사증후군을 치료할 수 있는 방법으로써 운동이 대두되고 있다. 아울러 대사에 대한 운동의 유익한 이점을 매개할 수 있는 분자로써 운동자극에 의해 발현이 증가하고, 대사 질환과도 연관이 있다고 알려진 Nr4a3와 Apelin은 비만과 제 2형당뇨 등 대사질환에서 그 역할이 확대되고 있다.

본 연구의 목적은 운동 처치와 식이 제한 처치 후 두 분자 Nr4a3와 Apelin의 발현 수준을 그룹에 따라 비교해 보고자 함에 있다. 또한 대사 이상과 관련이 있는 지표(Bodyweight, GTT, serum TC, TG, pAKT/AKT)와 함께 미토콘드리아의 기능과 관련된 분자인 AMPK, PGC1alpha, SDHA의 수준과 근육기능 지표의 변화에 운동 처치와 식이 제한이 어떻게 영향을 미칠 수 있는지 분석하고자 하였다.

대사 이상 모델을 유도하기 위해 8주간 고지방, 고설탕 식이를 공급하였고 이후 8주간의 식이 제한과 운동 중재를 실시하였다. 연구 기간 동안에는 실험 동물의 몸무게의 변화를 추적하였다. 중재 기간 이후 글루코스 저항성과 혈중 TC, TG 농도, Nr4a3, pAKT/AKT 및 미토콘드리아 기능관련 분자의 발현 수준 분석을 위해 생화학적 분석 방법인 단백질 추출을 통한 Western Blot 분석과 total RNA 추출을 통한 Real-time PCR 분석을 하였다. Apelin의 근육 농도와 혈중 농도 분석의 경우 ELISA방법을 실시하였다. 또한 근육의 기능적 표현형 분석을 위해 Grip strength와 Hanging test를 실시하였다.

자료의 통계적 분석방법으로써 유의수준은 $P < 0.05$ 수준으로 설정하였고 그룹간 비교는 One-way ANOVA, Student Independent t-test 통계법을 이용하였다. 운동과 식이 처치 간 상호작용 효과는 Two-way ANOVA로 분석하였다.

8주간의 대사이상 유도를 통해 대조군 대비 HFHS그룹의 몸무게가 유의미하게 증가되었으며, IPGTT결과 HFHS그룹 대비 ND, NDEX그룹이 혈중 글루코스 농도의 감소가 시간에 따라 유의하였다. 혈중 TC, TG 농도 또한 대조군 대비 HFHS그룹이 유의미하게 높은 수치를 보여 대사

이상 유도가 되었다고 할 수 있었다. 인슐린 신호 전달과 관련이 있는 pAKT/AKT의 비율의 경우 HFHS그룹대비 ND그룹에서 유의미하게 증가하였다. Nr4a3의 단백질 수준의 경우 HFHSEX그룹은 HFHS그룹 대비 유의미한 발현 수준의 증가가 관찰되어 운동의 효과가 나타났다. 혈중 Apelin의 경우 운동 처치에 의해 그 수준이 HFHSEX, NDEX그룹에서 유의미하게 감소되었으나 근육의 Apelin 농도는 8주간의 대사 유도가 된 그룹간 차이가 없었다. 미토콘드리아의 기능과 관련 있는 pAMPK/AMPK는 CON그룹 대비 CONEX그룹에서 유의미한 증가를 보여 운동의 효과가 나타났으며 8주간의 설탕제한은 pAMPK/AMPK비율과 PGC1alpha의 수준을 유의미하게 감소시켰다. 아울러 설탕제한 처치에 의해 SREX그룹에서는 Grip strength의 개선 효과가 나타났고, 8주간의 운동 처치에 의해 Grip strength와 Hanging time이 향상되었다.

이상의 결과를 바탕으로 고 지방, 고 설탕 식이는 대사 이상을 유발하였고, 8주간의 설탕제한, 설탕과 지방의 동시 제한, 운동 처치는 대사 지표의 개선과 근 기능 향상, pAKT/AKT의 수준의 증가를 유도하였다. 또한 운동은 고지방, 고설탕 식이로 인한 대사 이상 상태에서 Nr4a3의 발현을 증가시키고 증가된 혈중 Apelin의 수치를 감소시킬 수 있었다. 아울러 설탕제한 효과는 pAMPK/AMPK, PGC1alpha의 수준에 영향을 미쳐 미토콘드리아의 항상성 유지에 기여할 수 있다고 판단되며 운동 중재는 HFHSEX그룹에서 SDHA의 수준의 증가를 유도하여 미토콘드리아의 활성화에 기여할 수 있다고 예상된다.

따라서 본 연구에서 운동과 식이 제한 처치에 의해 변화된 분자들이 대사적 질환 상태에서 미토콘드리아의 기능 및 지질, 탄수화물 대사 등에 기전적으로 어떠한 역할을 할 수 있는지 추후 다양한 중재 기간과 운동 방법을 적용하여 심층적으로 연구할 필요가 있다고 사료된다.

주요어 : 대사증후군, Nr4a3, Apelin, 미토콘드리아 기능, 운동, 식이 제한
학 번 : 2017-23613

목 차

제 1 장 서론	1
제 1 절 연구의 필요성	1
제 2 절 연구의 목적	4
제 3 절 연구의 가설	5
제 2 장 이론적 배경	6
제 1 절 고지방, 고설탕 유도 마우스 모델과 대사증후군	6
제 2 절 Nr4a3	8
제 3 절 Apelin	11
제 4 절 미토콘드리아 기능	13
제 3 장 연구 방법	14
제 1 절 실험동물	14
제 2 절 연구설계	15
제 3 절 8주간의 대사이상 유도 프로토콜	17
제 4 절 운동 프로토콜	18
제 5 절 Hanging test 측정	19
제 6 절 Grip strength 측정	20
제 7 절 조직적출	21
제 8 절 Real-time PCR	22
제 9 절 Western blot	23
제 10 절 Enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA)	24
제 11 절 IPGTT test	25
제 12 절 자료처리	26
제 4 장 연구 결과	27
제 1 절 운동과 식이제한이 대사지표에 미치는 영향	27
제 2 절 Nr4a3 및 Apelin 발현 변화	31
제 3 절 미토콘드리아 기능 관련 분자 마커의 발현 변화	34
제 4 절 근 기능 관련 변화	37
제 5 장 논의	40
제 1 절 운동과 식이 제한이 대사지표 및 몸무게, 근육기능 등에 미치는 영향	40
제 2 절 Nr4a3 및 Apelin 발현 수준 확인	42
제 3 절 미토콘드리아 기능 관련 분자의 발현 수준 변화	44
제 6 장 결론 및 제언	47
제 1 절 결론	47

제 2 절 제언.....	48
참고문헌.....	50
Abstract	59

표 목차

[Table 1] Research group	14
[Table 2] Exercise protocol.....	18
[Table 3] Two-way ANOVA analyses testing the influence of exercise, diet and their interactions.....	36

그림 목차

[Figure 1] Research design.....	16
[Figure 2] Body weight, Body composition.....	29
[Figure 3] The effect of exercise and diet restriction on metabolic indexes	30
[Figure 4] The expression level of Nr4a3 and Apelin.....	33
[Figure 5] The expression level of Molecular markers of mitochondrial function	35
[Figure 6] The muscle function indicators.....	38
[Figure 7] Western blot image.....	39

제 1 장 서 론

제 1 절 연구의 필요성

최근 제2형 당뇨병, 심혈관 질환, 비만, 고혈압, 만성심부전, 대사증후군 등 다양한 만성질환이 전 연령층에서 증가하고 있는 실정이다. 특히 대사증후군은 여러 질환이 복합적으로 나타나는 질병으로 복부비만, 고 중성 지방 혈증, 고밀도 지단백 콜레스테롤, 고혈압, 인슐린 저항성을 그 특징으로 가지고 있다(Grundy et al., 2005; Yki-Jarvinen, 2014). 한국인을 대상으로 한 Huh et al. (2018)의 최근 연구에서는 2013-2015 국민건강영양조사 결과, 19세 이상의 성인에서 대사질환자의 비율이 약 20%, 60세 이상의 여성인구에서 40% 그리고 중년기 남성에서도 증가하는 추세에 있다고 보고되었다. Menke, Casagrande, Geiss, and Cowie (2015)의 연구에서도 당뇨 전 단계 이거나 당뇨를 가지고 있는 미국인 인구 비율이 50%에 육박한다고 하였다.

이러한 대사 증후군의 원인에는 여러가지가 있다. 그 중 하나를 에너지 대사의 불균형을 예로 들 수 있다(Canto & Auwerx, 2009). 또한 이러한 에너지 대사의 불균형은 세포의 에너지 대사에서 중심 세포 소기관의 역할을 하고 있고 아포토시스, 세포증식, 산화조절 등의 다양한 역할을 하는 미토콘드리아의 양과 질의 감소와 밀접한 연관이 있다(Mendrick et al., 2018). 예를 들어, 대사 질환의 일종인 T2DM(제2형당뇨)에서 에너지 균형은 매우 중요한 주제이다. T2DM은 근육의 미토콘드리아 기능과 연관이 있고, 물질대사의 교란과 연관이 있다는 것이 밝혀져 있다(Hesselink, Schrauwen-Hinderling, & Schrauwen, 2016). 또한, 대사증후군 모델에서 미토콘드리아의 생합성이 영향을 받는다는 보고도 있다(Ren, Pulakat, Whaley-Connell, & Sowers, 2010).

기본적으로 운동은 이런 대사성 질환의 개선에 효과가 있다. 대사증후군(비만, 고혈압, 이상지질혈증, 공복혈당 상승 및 당뇨)의 개선을 위해 치료적인 측면에서 수술이나 약물의 처치보다 상대적으로 안전하며 심폐기능의 향상, 근력과 근지구력의 향상 등 생리적으로 다양한 이점이 있고 비용의 절감 또한 이끌어 낼 수 있는 대표적인 방법이 ‘운동’이다. 그러나 다양한 형태와 강도의 운동 방법들이 질환

상태의 개선을 위해 제시되고 있지만, 그 효과에 대해서는 아직 불분명한 상황이다. 또한 식이 제한도 대사성 질환에 효과가 있다고 알려져 있는데, 식이 제한의 방법으로써 칼로리의 제한과 운동 처치는 모두 대사증후군의 발병율을 낮췄고 두 처치를 동시에 하게 되면 그 효과가 더 뛰어났다고 하였다(Anderssen, Carroll, Urdal, & Holme, 2007). 또한 Kim et al. (2000)는 75%의 고지방식이 섭취의 감량이 내장지방의 감소와 근육의 인슐린 저항성을 높인다고 보고하였고, 관련 메타분석 연구에서도 칼로리 제한, 저지방 식이, 식이 섬유 섭취 증가 등과 함께 운동 처치를 시행했을 때 제 2형 당뇨의 발병률을 낮춘다고 하였다(Orozco et al., 2008). 그러나 아직 운동과 식이 제한, 특히 설탕의 제한 효과가 대사 증후군의 지표에 미치는 효과는 명확히 정립되지 않은 상황이며 대사증후군을 효과적으로 개선하기 위한 치료법으로써 심층적으로 비교 및 분석 연구가 진행되어야 할 필요성이 있다.

한편 운동 자극에 의해 근세포에서 나타나는 유전자의 전사단계, 번역단계, 번역 후 단계 등의 세포내 물질 변화에 대한 탐구는 운동의 단기 효과를 넘어 중, 장기 효과를 이해하는데 중요하다(Kanzleiter et al., 2009). 같은 맥락에서 운동자극에 의해 변화한다고 알려진 물질인 Apelin과 Nr4a3는 운동자극에 의해 조절되어 잠재적인 생리적 반응의 매개자로서 역할을 할 수 있고 물질 대사와 관련이 있음을 고려할 때 심층적인 연구가 필요하다고 할 수 있다.

Nr4a3는 유산소 운동에 대한 생리적 반응의 ‘적응’ 역할을 할 수 있으며 글루코스과 지방산 대사, GLUT4의 세포막 이동, 미토콘드리아의 수의 증가 등과 관련이 있다(Pearren & Muscat, 2010; Pearren & Muscat, 2018; Pearren et al., 2008).

유리 펩타이드인 Apelin 또한 생리적으로 물질대사와 관련하여 다양한 역할을 할 수 있는데 지방세포와 골격근에서 PI3K-AKT 신호전달과 관련이 있다는 연구가 있으며 Apelin을 인슐린 저항성 쥐에 처치하게 되면 지방산산화, 미토콘드리아 산화 능력과 미토콘드리아 생합성 수준이 변화한다는 연구가 있다(Castan-Laurell et al., 2011; Castan-Laurell, Dray, Knauf, Kunduzova, & Valet, 2012). 또한 Castan-Laurell et al. (2012)에 따르면 고지방식으로 유도된 인슐린 저항성 쥐에게 Apelin을 4주동안 처치한 결과 가자미근에서 미토콘드리아의 생합성이 증가했다고 알려져 있다.

그러나 운동과 식이 제한, 즉 설탕의 제한 또는 지방과 설탕의

제한이 선행 연구로부터 대사의 개선에 역할을 할 수 있다고 알려진 Apelin과 Nr4a3의 단백질 수준에 미치는 영향을 분석한 연구는 불충분한 상황이며 특히 설탕의 섭취가 점차 증가하고 있고, 이러한 설탕의 섭취가 지방간, 이상지질, 인슐린 저항성, T2DM, 몸무게의 증가, 혈중지질 증가, 인슐린 민감도 감소 등과 관련이 있다는 점을 고려할 때, 설탕을 제한한 경우와 운동 처치가 두 분자에 미치는 영향에 대한 비교는 거의 전무한 상태이다. 아울러 운동과 식이 제한이 시너지 효과가 있는지 또는 함께 작용하였을 때에 두 분자에 어떠한 효과가 있는지도 미흡한 상황이다.

본 연구에서는 고지방식이와 설탕물 공급을 통하여 비만유도가 된 쥐를 대상으로 그룹에 따른 식이 제한과 운동 처치가 근육에서의 물질대사와 관련이 있는 두 분자 Apelin과 Nr4a3의 발현 수준에 미치는 효과를 분석하고자 한다. 또한 대사증후군 관련 대사 지표와 함께 근육 기능 관련 표현형의 변화를 그룹에 따라 비교 분석하고자 하였고 식이 제한과 운동이 미토콘드리아의 기능과 관련 있는 AMPK, PGC1alpha, SDHA 등의 분자의 수준에 미치는 영향을 알아보하고자 하였다.

제 2 절 연구의 목적

본 연구의 목적은 운동과 식이 제한이 두 분자 Apelin과 Nr4a3의 발현과 대사지표 및 미토콘드리아 기능과 관련한 분자의 발현, 근육 기능 관련 지표에 미치는 영향을 비교하고자 함에 있다.

1. 운동과 식이 제한에 따른 Nr4a3, Apelin의 발현의 변화와 대사 이상과 관련이 있는 지표(Bodyweight, GTT, TC, TG)의 수준 변화를 근육에서 관찰하고자 함.
2. 미토콘드리아의 기능과 관련된 분자인 AMPK, PGC1alpha, SDHA의 수준에 운동 처치와 식이 제한이 어떻게 영향을 미칠 수 있는지 비교하고자 함.
3. 근육 기능 관련 지표인 Grip strength와 Hanging time에 운동 처치와 식이 제한이 어떻게 영향을 미칠 수 있는지 비교하고자 함.

제 3 절 연구의 가설

1. 대사지표

식이 제한과 운동은 대사 지표(TG, TC, GTT, Body weight)를 개선시킬 것이다.

2. Nr4a3와 Apelin의 발현

1) Nr4a3의 발현 수준은 HFHS, HFHSEX, SR, SREX, ND, NDEX 그룹에 따라 차이가 있을 것이다.

2) Apelin의 발현 수준은 HFHS, HFHSEX, SR, SREX, ND, NDEX 그룹에 따라 차이가 있을 것이다.

3) 미토콘드리아 기능관련 분자.

미토콘드리아의 기능과 관련한 분자의 발현 수준은 HFHS, HFHSEX, SR, SREX, ND, NDEX 그룹에 따라 차이가 있을 것이다.

3. 근육 기능 관련 지표

식이 제한과 운동은 근육 기능 관련 지표(Grip strength, Hanging time)에 그룹에 따라 서로 다른 영향을 미칠 것이다.

제 2 장 이론적 배경

제 1 절 고지방식이, 설탕물 유도 마우스 모델과 대사 증후군

대사 증후군은 대사의 교란에 의해 일어나며 유전적요인, 환경적 요인 등과 같은 다양한 요인들이 복합적으로 작용함으로써 발생한다. 대사증후군의 표현형으로써 높은 중성지방, 낮은 HDL 콜레스테롤, 고혈압, 글루코스 저항, 기준치 이상의 허리둘레 등이 대표적이다(Magliano, Shaw, & Zimmet, 2006).

기존 선행 연구에 따르면 대사증후군은 관상성 심장질환 및 제2형당뇨의 중요한 위험 인자이며 대사 신호전달에 관여하는 유전자의 돌연변이 및 단백질의 억제와 함께 비활동성, 복부비만, 식이의 종류 등이 대사증후군의 주요 요인 중 하나라고 하였다(Eckel, Grundy, & Zimmet, 2005; Grundy, 2005). 또한 대사증후군은 심장질환(Marchesini et al., 2003), 지방간(Asrih & Jornayvaz, 2015), 신장질환(Huh et al., 2017), 만성염증(Cooke, Connaughton, Lyons, McMorro, & Roche, 2016) 등 과도 관련이 있다고 보고되었다.

많은 연구에서 고지방식은 비만과 이상지질 혈증을 일으키고 고지방식에 고설탕 식이를 함께 처치하면 이상혈당과 고혈압까지 유도할 수 있다고 보고 하였다(Wong, Chin, Suhaimi, Fairus, & Ima-Nirwana, 2016). Bhatta et al. (2017)의 연구에서는 대사 증후군과 연관이 있는 비정상적인 혈관의 기능이 고 지방, 설탕 물을 먹인 쥐에서 관찰되었으며 설치류를 대상으로 16주간의 고지방, 고설탕 식이를 공급한 연구에서는 몸무게의 점진적인 증가와 함께 복부지방 증가, 글루코스 저항성, 이상지질, 고 인슐린 혈중, 등 다양한 대사 관련 지표들이 증가된 것이 보고되었다(Panchal et al., 2011). 본 연구와 동일한 모델인 C57BL/6를 이용한 연구에서도 21%의 지방과 34%의 수크로스를 함유한 식이를 4주동안 처치한 결과 처치전과 비교하여 몸무게와 혈중 인슐린의 유의미한 증가, 간조직에서의 지방 양 증가가 유도되었고 간과 백색지방에서 qPCR 분석을 진행한 결과 지질대사와 염증관련 유전자들의 증가와 인슐린 신호전달 관련 유전자의 감소가 보고 되었다(Yang, Miyahara, Takeo, & Katayama, 2012). C57BL/6쥐를 대상으로 한 다

른 연구에서는 16주의 고지방 식이 공급이 비만과 고 혈중 글루코스 농도, 이상지질을 일으켰다(Fraulob, Ogg-Diamantino, Fernandes-Santos, Aguila, & Mandarim-de-Lacerda, 2010). 이러한 선행연구 결과를 종합하여 볼 때, 본 연구에 적용한 8주간의 고 설탕, 고지방 식이 공급은 대사증후군과 관련한 고 지질 혈중, 고 혈당, 비만 등 대사 이상을 일으키기에 적합한 처치라고 판단된다.

한편 이러한 대사 이상을 메커니즘 적인 측면에서 살펴보면, 돼지를 대상으로 한 연구 결과 고지방, 고설탕 처지 그룹에서 인슐린 저항성의 판단 지표인 HOMA-IR가 대조군 대비 2.9배 증가하였고, 인슐린 민감도는 24.8퍼센트 줄어들었다고 보고되었다(Y. Liu et al., 2017). 이러한 결과는 p-AKT에 의한 GLUT의 위치이동 관련 신호전달의 교란이 관련이 있을 수 있는데, 이와 관련한 대표적인 신호전달 경로는 IRS2-PI3K-AKT가 있다. 관련된 선행 연구로써 고지방, 고 설탕 식이를 설치류에게 공급한 결과 글루코스 저항성이 교란되었고 인슐린 저항성 관련 지표가 증가한 결과가 보고되었으며 이러한 병리적 현상은 간조직에서의 IRS2, AKT, PI3K 그리고 Glycogen synthase(GS)의 발현량을 유의미하게 감소시켰다는 연구 결과가 있다(Xu et al., 2016).

이처럼 고지방 고설탕 식이가 미치는 영향은 다양하게 연구되고 있는 실정이나 설탕과 같은 특정 식이 제한과 운동이 대사증후군 지표와 근육의 운동 적응과 관계 있는 분자 및 미토콘드리아 기능에 미치는 영향과 관련한 연구는 아직 부족한 상황이며 심층적으로 연구되어야 할 필요성이 있다.

제 2 절 Nr4a3

Nr4a3는 orphan nuclear hormone receptor의 일종으로써 직접 결합할 수 있는 리간드가 아직 발견되지 않았고 전사인자로서의 활성은 그것의 발현 정도에 의해 영향을 받는 핵 수용체 중 하나이다(Ferran et al., 2016). 핵 수용체는 그 자체로 DNA에 붙어 전사인자로의 역할을 할 수 있으므로 Nr4a3도 같은 방식으로 전사인자의 기능을 할 수 있는데, 다양한 자극에 의해 발현이 증가한다고 알려져 있고 주로 근육세포와 같은 조직에서 발현되어 생리적인 반응을 매개한다고 보고되었다(Pearren & Muscat, 2012).

다양한 생리적 기능 중 Nr4a3는 특히 대사와 관련이 있다. Nr4a3와 Nr4a1을 동시에 knock out 시킨 쥐가 정상 쥐보다 몸무게가 무거웠으며, 췌장으로부터의 인슐린 분비가 망가지는 현상을 보였다(Smith, Kener, & Tessem, 2018). 또한 Q. Liu, Zhu, Xu, Fu, and Garvey (2013)에 따르면, L6쥐의 골격근에서 6-Mercaptopurine에 의해 Nr4a3의 전사체와 단백질의 발현양이 증가하는데, 이는 GLUT4의 translocation을 증가시켜 글루코스 이용을 향상시킨다고 보고하였다. 그리고 Nr4a3의 기능을 확인할 수 있는 과 발현 실험과 shRNA를 이용한 유전자 knock down 기법을 myoblast인 C2C12 세포에 적용하였을 때에, 인슐린에 의한 글루코스 이동 정도와 AKT의 인산화가 Nr4a3의 과 발현 상태에서 유의하게 증가하였다(X. Zhu et al., 2013). 이와 같은 선행 연구를 종합해 볼 때, Nr4a3는 인슐린의 민감도를 높이며 그 생성을 증가시키는 방향으로 작용한다는 것을 알 수 있다. 따라서 대사질환 특히 비만, 당뇨 등의 경우에서 긍정적인 역할을 할 수 있을 것으로 판단된다.

Nr4a3는 유산소 운동 자극에 의해 발현이 자극된다고 알려져 있다. 유산소 운동 후, 핵 수용체인 Nur77, Nurr1 와 Nr4a3의 mRNA 수준이 증가되었고(Mahoney, Parise, Melov, Safdar, & Tarnopolsky, 2005), 일회성의 운동과 운동자극과 유사한 전기적 자극을 C2C12 세포에 가했을 때도 Nr4a3의 발현이 증가하는 것을 알 수 있었다. 그리고 같은 연구에서 Nr4a3의 프로모터 부위에서 메틸기의 유리현상이 일어나는 것이 보고 되었다(Pattamaprapanont, Garde, Fabre, & Barres, 2016). 이는 운동 자극에 의해 Nr4a3의 유전자의 발현이 활성화된다는 의미로 해석된다. 또한 Nr4a3의 발현을 증가시키기 위해 Beta-adrenergic 신호전달을 활성화하는 방법이 있다. 운동 자극과 유사한

Beta-adrenergic 신호자극이 가해지게 되면, 지근, 속근 근섬유 모두에서 Nr4a3의 발현이 증가하고, 증가된 Nr4a3의 발현은 근육의 지방산화 관련 유전자인 PGC1alpha, lipin-1alpha, FOXO1등을 촉진한다고 하였다(Pearren et al., 2008). 인간의 근육에서 인슐린에 의해 유도되는 유전자발현을 전체적인 관점에서 관찰한 다른 연구에서도 Nr4a3가 인슐린 자극에 의해 상향조절 되었다(Wu et al., 2007). 그리고 C2C12 세포를 이용한 In vitro 상에서 진행된 si-RNA에 의한 Nr4a3의 기능 억제 실험에서는 지방산화의 감소, 젖산생성의 증가와 같은 비 산소성 대사의 증가로 인한 유산소성 대사의 억제에 대한 저항성을 보였다(Pearren et al., 2008). 산소성대사와 관련하여 세포내에서는 미토콘드리아의 역할이 매우 중요한데, 쥐의 근육에 Nr4a3를 과 발현시켰을 때에, 미토콘드리아의 숫자, 단백질과 DNA의 양, 발현이 증가된다는 것이 보고되었다(Pearren et al., 2012). 이는 Nr4a3가 산소를 이용하는 유산소성 대사에서 그 역할을 할 수 있고, 비만이나 인슐린 저항성 상태의 개선에 유산소성 대사가 중요한 역할을 한다는 것을 고려할 때, Nr4a3가 치료적인 관점에서 유산소성 대사에서 잠재적인 역할을 할 수 있는 단백질이라고 유추할 수 있다. 실제로 교감신경의 자극에 의해 인체의 다양한 기관 근육, 심장, 뇌, 간, 지방세포 등에서 대사와 관련하여 역할을 할 수 있을 것 이라고 제시한 사실이 고찰 되었다(Pearren & Muscat, 2010).

한편, Nr4a3는 고지방, 고설탕 식이에서 발현 수준이 변한다고 알려져 있다. 인슐린 저항성과 당뇨병 설치류 모델의 근육과 지방세포에서 Nr4a3, Nr4a1의 mRNA 발현은 줄었다(Fu, Luo, Luo, Zhu, & Garvey, 2007). Goncalves, Cavaletti, Pasqualucci, Martins, and Lin (2017)의 연구에서는 과당을 설치류에게 8주 동안 공급한 결과 몸무게와 혈중 중성지방의 농도가 증가하였고, 운동자극에 의해 유도되는 PGC1alpha, GLUT4, NR4a3 등이 유의하게 감소되었다.

그리고 Nr4a3는 운동과도 관련이 있다. 운동 자극에 의해 그것의 mRNA의 발현은 높은 수준으로 증가하고(Catoire et al., 2012), 운동에 의해 유도된 근육에서의 Nr4a3의 과발현은 칼슘 신호전달과 관련이 있고 결과적으로 근육의 혈관생성 및 비대를 촉진한다(Goode et al., 2016).

이와 같이 Nr4a3는 대사와 밀접한 관련이 있고 운동자극에 의해 조절된다는 다양한 연구가 있다. 그러나 설탕의 억제를 통한 칼로리 제한과 운동자극이 근육의 Nr4a3의 발현에 미치는 영향을 함께 비교한 연구는

부족한 실정이며, 둘의 시너지 효과를 본 연구 또한 전무하다. 또한 미토콘드리아의 기능과의 관계에 관한 연구는 매우 부족한 상황이다. 따라서 구체적인 대사지표의 변화와 Nr4a3의 발현 수준 분석을 식이 제한과 운동 처치에 따라 심층 분석할 필요성이 있다.

제 3 절 Apelin

Apelin은 생리 활성이 있는 펩타이드 호르몬의 일종으로써 GPCR 수용체인 APJ에 붙어 그 기능을 하며 bovine stomach 추출물에서 처음 발견되었다(Boucher et al., 2005). Apelin은 한가지 형태가 아닌 다양한 길이의 펩타이드 형태로 존재하며 소화기관, 뇌, 심장, 혈관 등 다양한 조직에서 발현 되어 생리적인 역할을 한다(Carpene et al., 2007). 이러한 Apelin과 대사와 관련한 연구로써 고 인슐린 혈중 상황에서 Apelin과 Apelin 수용체의 발현양은 지방세포와 근육에서 유의하게 증가하였고 인슐린 저항성의 정도에 따라 그 정도가 변한다고 보고된 바 있다(Dray et al., 2010). 구체적으로는 Apelin mRNA의 근육에서의 발현은 고지방식이를 먹인 쥐는 대조군과 비슷하였고 인슐린 저항성 모델 쥐에서는 감소하였다. 그러나 인슐린 저항성을 가지고 있는 젊은 쥐와 늙은 쥐 사이에서는 유의한 변화가 없었다. 사람의 근육에서 대조군과 인슐린 저항성 그룹간 인슐린 투여 전 후의 Apelin 발현양을 비교하였을 때도 유의미한 차이가 나타나지 않았다(Dray et al., 2010). 또한 Son et al. (2017)에 의하면 제 2형 당뇨 설치류 모델의 근육에서 운동 전과 후 Apelin 단백질의 발현은 차이가 없었고, 혈청에서의 높은 Apelin의 수준과는 달리, 가자미근에서의 Apelin 수준은 낮았다.

이러한 Apelin은 비만과도 연관이 있는데, 비만 쥐에서 글루코스 조절에 관여하며 NO 합성경로나 AMPK 경로 및 AKT 경로를 통해 Apelin이 글루코스 저항성을 개선시키고 그것의 이용을 촉진시킨다는 연구가 보고되었다. 또한 Apelin을 정맥에 주사한 결과 혈중 글루코스 수준이 감소된 것을 확인하였다(Dray et al., 2008; S. Zhu et al., 2011).

한편 Apelin은 대사 질환에서 그 수준이 변화한다고 알려져 있다. Karbek et al. (2014)에 따르면, 대사증후군을 가진 성인 남성과 여성을 대상으로 혈청 수준에서 Apelin의 양을 분석한 결과 Apelin-12와 36의 형태가 유의미하게 대조군 대비 높았다는 보고가 있다. Boucher et al. (2005)의 연구에서도 비만 환자에서 혈중 Apelin과 인슐린 수준이 유의하게 증가한다고 하였다. 비만과 염증 상황에서 증가하는 물질인 TNFalpha의 수준과 지방세포에서의 Apelin의 수준이 정적인 관계에 있다고 보고된 연구도 있다(Daviaud et al., 2006). 이와 같은 선행연구를 볼 때, 혈액이나 지방세포와 같은 조직에서의 Apelin 발현양은 대사 이상 모델에서 활발하게 연구가 되어 왔지만 대사이상 모델에 운동을 시행하고 식이 조절을 각각 또는 함께 했을 때에 그 발현양을 근육에서 분석

한 연구는 아직 부족한 실정이다.

Apelin은 다양한 질병과 자극에 의해 그 발현양이 변화되고 혈중으로 분비되는 양 또한 변하는데, Apelin이 운동과 관련이 있다는 사실 또한 밝혀지고 있다. Besse-Patin et al. (2014)에 따르면, Apelin이 운동 자극에 의해 인간의 primary myotube에서 그 발현이 유의미하게 증가하며 이는 cAMP와 칼슘과 관련된 신호전달과 관련이 있다고 하였다. 그리고 비만 남성에서 인슐린 민감성의 개선과 Apelin이 관계 있다는 것이 밝혀 졌다. 한편, 몸무게의 감소와 Apelin과의 관련성을 연구한 740명 대상의 Cross-sectional 연구인 Krist et al. (2013)에서는 제 2형 당뇨병을 가지고 있는 사람의 adipose tissue에서 Apelin의 mRNA 수준이 증가했는데, 비만 수술에 의한 몸무게의 감소와 운동 자극 모두 subcutaneous adipose tissue와 혈중 Apelin 수준을 줄인다고 보고되었다.

이러한 Apelin과 관련한 선행연구들을 살펴볼 때, 특정 식이 제한과 Apelin의 관계를 연구한 사실은 미흡하며 운동과 식이 제한의 시너지 효과를 본 연구는 매우 부족한 상황이다. 비만과 대사 이상을 치료하는데 운동과 식이 제한이 중요한 역할을 하고 Apelin 또한 생리적으로 중요한 역할을 하는 만큼, 본 연구에서는 마우스를 대상으로 대사이상을 유도하고 이 둘의 Apelin 발현에 대한 효과를 보고자 하였다.

제 4 절 미토콘드리아 기능

미토콘드리아는 세포가 정상적으로 기능을 하는데 중요한 요소이며 세포의 다양한 물질 대사의 중심기관으로써(Fischer, Hamann, & Osiewacz, 2012), 근육세포 에서도 생존과 관련하여 중요한 기능을 한다. 따라서 미토콘드리아의 기능과 생성, 소멸의 균형이 깨어지게 되면 다양한 병리적인 현상이 나타나는데, 대사증후군, 암, 제 2형당뇨, 신경 질환 등이 이와 연관되어 있다(Golpich et al., 2017). 그 중, 대사 증후군은 에너지 대사의 불균형이 주요한 요인이기 때문에 에너지 대사와 관련이 깊은 미토콘드리아와 특히 연관성이 깊다고 할 수 있다(Held & Houtkooper, 2015; Rozendaal, Wang, Hilbers, & van Riel, 2019). 또한 각 세포의 미토콘드리아의 산소이용능력은 결국 몸의 전체적인 산소 이용량과 직결된다고 할 수 있는데, Coen et al. (2013)의 연구에 따르면 미토콘드리아의 기능적인 감소, 즉 최대 ATP 생산량/최대 산소 소비량의 감소는 노인에게서 낮은 최대산소섭취량과 걸음속도를 보였다. 그리고 분자 기전학적인 연구에서도 근육의 미토콘드리아 관련 단백질의 이상은 신체적 유산소성 대사의 감소와 관련 있는 인슐린 저항성, 고 지혈증, 고혈압 등과 같은 다양한 대사 이상 관련 질병들과 정적인 관계가 있다는 것이 보고되었다(Wisloff et al., 2005). 다른 선행연구에서도 미토콘드리아의 ATP합성의 감소는 제2형당뇨와 관계가 있고 인슐린 저항성 모델인 *db/db* 쥐 모델의 지방세포에서도 미토콘드리아의 기능 감소가 보였다(Petersen, Dufour, Befroy, Garcia, & Shulman, 2004) (Choo et al., 2006).

한편 미토콘드리아와 관련한 세포내 주요 신호 전달기전으로써 미토콘드리아의 생합성 신호전달인 PGC1alpha-NRF1-TFAM 경로가 있으며(Vina et al., 2009), AMPK의 경우도 뉴클레오솜의 변형을 일으켜 미토콘드리아의 생합성과 기능과 관련한 유전자의 발현을 촉진한다는 연구 결과가 있다(Marin et al., 2017).

미토콘드리아의 생합성은 그것의 절대적인 양과 질에 직접적인 관련이 있으므로 대사 질환 상태에서 감소된 미토콘드리아의 기능적인 측면과도 그 관련성이 있을 수 있다고 판단된다. 따라서 본 연구에서는 미토콘드리아가 생리적 대사 및 근육의 기능적인 측면에서 중요한 역할을 하는 만큼, 운동과 식이 제한에 따라 미토콘드리아의 기능과 관련한 주요 분자의 단백질과 mRNA 발현의 변화를 분석해 보고자 하였다.

제 3 장 연구 방법

제 1 절 실험동물

본 연구에서 사용한 실험동물은 3주령의 수컷 C57BL/6 쥐로 중앙실험동물로부터 구입하여 서울대학교 수의과대학 동물실험실에서 사육하였다. 실험동물은 온도 $22\pm1^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm2\%$ 의 specific pathogen-free (SPF) 시설에서 사육되었고 12간을 주기로 명암이 조절되었다. 물과 사료는 적절하게 공급하였으며 동물 실험승인은 서울대학교 IACUC로부터 승인을 받았다(승인번호 SNU-170518-9). 실험동물은 총 8개의 그룹으로 무작위 추출을 통해 나누어 cage당 3~4마리 배정하여 분리 사육하였고 쥐의 상태를 사육기간동안 면밀히 관찰하였다. 본 연구의 실험자는 서울대학교에서 진행하는 동물 실험 워크숍을 수료하였다(ILAR-17-09-357).

Group abbreviation	Group explanation		Intervention	Intervention Duration
	Diet	Exercise		
CON	Normal chow	No	No intervention	None
CONEX	Normal chow	Treadmill	Exercise	8 Weeks
SR	High fat	No	Sucrose restriction	8 Weeks
SREX	High fat	Treadmill	Sucrose restriction, Exercise	8 Weeks
HFHS	High fat, High sucrose	No	Fat, sucrose feeding	8 Weeks
HFHSEX	High fat, High sucrose	Treadmill	Fat, sucrose feeding, Exercise	8 Weeks
ND	Normal chow	No	Fat, sucrose restriction	8 Weeks
NDEX	Normal chow	Treadmill	Fat, sucrose restriction, Exercise	8 Weeks

Table 1. Research Group

제 2 절 연구설계

본 연구는 쥐의 근육에서 Nr4a3와 Apelin에 대한 식이 제한과 저항성 운동의 효과를 알아보기 위해 4주령의 쥐를 대상으로 8주간의 대사 증후군을 유도한 후, 8주간의 유산소운동 처치를 하여 그룹별로 Nr4a3와 Apelin의 전사체와 단백질의 발현양을 확인하였다. 이후 식이 제한과 운동의 효과를 관찰하기 위해 그룹은 총 8그룹으로 랜덤하게 나누어 진행하였다. 생화학적 분석을 위한 실험동물은 대조군(n=6), 대조군+운동 그룹(n=6), 고지방식이 군(n=6) 고지방식이+운동 군(n=6), 고지방식이와 설탕물 군(n=6), 고지방식이+고설탕+운동 군(n=6) 그리고 설탕물과 고지방식이 제한 그룹(n=6), 설탕물과 고지방식이 제한+운동그룹(n=6)으로 나누어 진행하였고, IPGTT와 대사지표 등의 측정을 위한 실험동물도 동일하게 사육하여 같은 그룹에 추가로 배정하였다(n=5).

실험동물 구입 후 일주일간의 적응기간을 거친 후, 대사이상 쥐를 유도하기 위한 방법으로써 8주간의 고지방식이와 설탕물을 공급하여 대사이상상태를 유도하였다. 음식에 대한 접근은 자유로웠고 쥐의 몸무게와 식이 섭취량은 규칙적으로 일주일에 3번 측정하였다. 생화학적 분석을 하지 않는 쥐를 대상으로 근지구력 표현형을 평가하기 위해 Hanging test와 Grip strength, GTT test등을 실시하였다.

아울러 8주간의 트레드밀 운동을 매일 한 시간씩 주 5일, 8주동안 실시하였고 중재가 끝난 후에는 48시간 이내에 부검을 진행하였다. 그 후 근육과 혈액조직의 생화학 분석을 Western blot, qPCR, ELISA 등의 방법으로 진행하고 통계적 분석을 실시하였다.

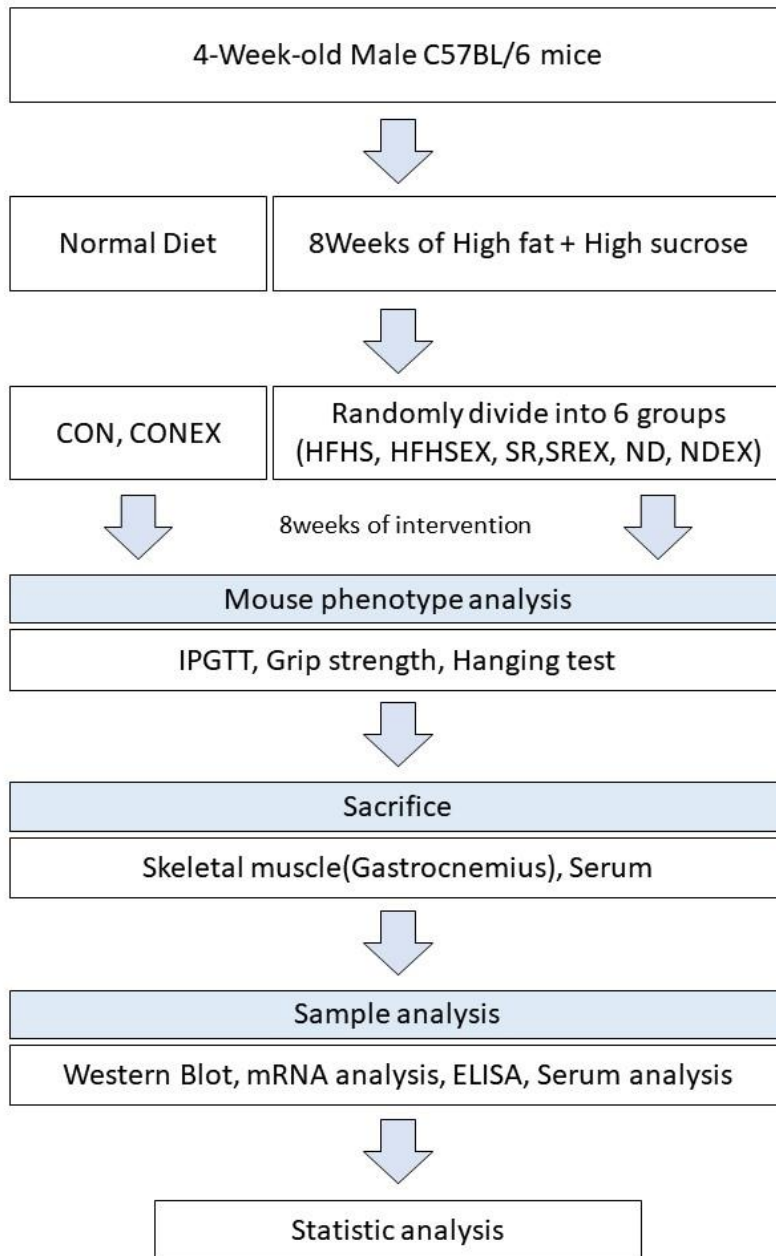


Figure 1. Research design

제 3 절 8주간의 대사이상 유도 프로토콜

대조군을 제외한 모든 쥐는 8주간 비만 유도를 하였다. 비만 유도를 위한 사료는 60%의 fat, 20%의 protein, 20%의 carbohydrate를 함유하였다(Research Diet D12492). 대조군을 위한 사료는 일반적인 영양소 비중을 가지고 있는 20%의 protein, 70%의 carbohydrate, 10%의 fat을 함유한 사료를 이용하였다(Research Diet D12450J). 각 사료의 kcal는 각각 5.24, 3.85kcal였으며 신선도 유지를 위해 주 3회 새로운 사료를 공급하였다.

설탕물의 경우 고압, 고온 살균된 증류수를 이용하여 24%의 설탕물을 만들어 쥐들에 공급하였으며 마찬가지로 신선도 유지를 위해 주 3회 이상 새로운 병과 설탕물로 교체해 주었다.

제 4 절 운동 프로토콜

운동 그룹에 대한 트레드밀 운동은 마우스용 트레드밀 인 Exer 3/6 treadmill, Columbus Instruments, Ohio를 이용하여 중재를 실시하였다. 적응운동은 2일동안 시행하였다. 1일째 적응운동의 경우, 5분간 8m/min의 속도로 진행하였고 2일째 적응운동은 5분간 8m/min을 달린 후, 5분간 10m/min으로 마무리하였다. 8주간 진행된 본 운동의 경우에는 운동 시작 후 최종 12m/min에 도달할 때까지 매 2분간 2m/min씩 속도를 증가시켜 12m/min에 도달한 후 1시간 동안 12m/min의 일정한 속도로 운동 시켰다. 이후 5분간 5m/min으로 정리운동을 실시하였다. 경사도는 12° 였다. 운동 처치 기간동안 쥐의 상태를 면밀히 관찰하였으며 잘 달리지 않는 쥐는 부드러운 붓을 이용하여 쥐의 뒷부분을 두드려 주었다. 쥐의 부상을 방지하기 위해 트레드밀 끝부분에 스폰지를 장착하였다. 운동 처치는 충분한 준비 운동과 정리 운동을 실시하였으며 점증 부하법을 따랐다.

Slope gradient 12°	1 st Adaptation	2 nd Adaptation	1 week	2 week	3 week	4 week	5 week	6 week	7 week	8 week
Time(min)	5	5+5	60	60	60	60	60	60	60	60
Speed(m/min)	8	8, 10	12	12	12	12	12	12	12	12

Table 2. Exercise protocol

제 5 절 Hanging test 측정

마우스의 근지구력을 측정하기 위한 방법으로써, Hanging test를 그룹당 5마리씩 실시하였다.

250mm X 200mm, 1cm 규격의 철 grid에 쥐를 올려 놓고 쥐가 grid를 잡은 것을 확인한 뒤 천천히 grid를 뒤집고 고정시켰다. 이후 쥐가 떨어 지기 직전까지의 시간을 측정하였다. 두 번 연속하여 측정하였으며, 너무 빨리 떨어지거나 의지를 보이지 않을 때는 휴식 후 다시 측정하였다. 마우스가 낙하하는 지면에는 스폰지를 깔아 두었고 두 번의 측정값을 더한 값을 이용하여 근지구력을 측정하였다.

제 6 절 Grip strength 측정

쥐를 측정 grid위에 올려놓고 grid를 충분히 잡도록 하였다. 이후 천천히 고리를 당겨 쥐가 grid를 놓치는 순간의 힘을 grip strength meter를 이용하여 기록하였다. 각각의 쥐마다 3번의 test를 실시하였으며 3번의 시도 중 가장 높은 값을 데이터 분석에 이용하였고 Grip strength의 값은 몸무게로 보정하였다.

제 7 절 조직 적출

마지막 운동 처치가 끝난 후 12시간 fasting을 실시하였고, 이후 마취하여 적출하였다. 동물의 마취는 Isoflurane을 사용하여 흡입 마취를 진행하였다. 적출한 근육조직은 무게를 측정한 뒤 즉시 액체 질소에 냉각하였고 추후 분석시까지 -80°C 에 보관하였다.

제 8 절 Real-time PCR

미토콘드리아 기능 관련 전사체와 Nr4a3, Apelin의 mRNA 수준을 분석하기 위해 적출된 근육 조직에서 Trizol을 이용하여 total RNA를 추출하였다. Isopropanol을 넣고 원심분리 한 뒤, mRNA를 추출하였고, 70%알코올을 이용하여 충분히 washing해 주었다. mRNA의 농도는 260nm값을 이용해 결정하였으며, RNA의 quality check는 260/280nm 비율 값으로 판단하였다. 이후 Bioneer사의 Accupower cyclescript RT premix(dT20)을 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 mRNA를 역전사하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 RbTaq Fast qPCR 2X PreMix와 Primer를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 실시간으로 증폭된 전사체를 분석하였다. 분석은 Real-Time PCR(Bio-rad)를 이용하였고 CFX Manager™ Software를 통해 상대 발현량을 분석하였다. 분석된 Ct값은 $\Delta\Delta C_t$ 방법을 통해 GAPDH로 정규화 하여 계산하였다. Real-time PCR에 사용된 Primer의 서열은 다음과 같다:

Nr4a3 (forward, 5' -CAGTGTCGGGATGGTTAAGGAA-3' ; reverse, 5' -CAGACGACCTCTCCTCCCTTT-3'),

Apelin (forward, 5' -GTTGCAGCATGAATCTGAGG-3' ; reverse, 5' -CTGCTTTAGAAAGGCATGGG-3'),

APJ (forward, 5' -CTCAGCAGCTACCTCATCTTTGT-3' ; reverse, 5' -TGAAGTGGCCACCATAGAGTAGT-3'),

SDHA (forward, 5' -GGAACACTCCAAAAACAGACCT-3' ; reverse, 5' -CCACCACTGGGTATTGAGTAGAA-3'),

GAPDH (forward, 5' -AGGTTCGGTGTGAACGGATTTG-3' ; reverse, 5' -TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3')

제 9 절 Western blot

본 연구에서는 미토콘드리아 기능 관련 전사체와 Nr4a3, Apelin의 발현 수준을 Western blot의 방법으로 분석하였다. immunoblotting을 위한 단백질을 추출 방법으로 lysis buffer인 RIPA버퍼(ThermoFisher Scientific, #89900)와 함께 Protease inhibitor(Roche, #4693159001), Phosphatase inhibitor(Sigma-Aldrich, #4906845001)를 이용하였다. 근육 조직은 정량은 BCA방법을 이용하였고 Pierce BCA protein assay kit(Thermo Scientific)을 이용하여 진행하였으며, 정량한 단백질은 SDS buffer를 넣어 -20°C 에 보관하였다.

보관된 단백질 sample은 12%의 acryl amide gel을 이용하여 Gel 끝부분까지 sample이 충분히 내려오도록 SDS 전기 영동을 하였고 Transfer를 진행하였다. Transfer는 100V 조건에서 90분동안 진행하였다. 이후 5% skim milk-TBST를 이용하여 blocking을 진행하였고 1차 항체 Phospho-Akt (Ser473) Antibody #9271 (1:1000), Anti-PGC1 alpha antibody #ab54481 (1:1000), Akt Antibody #9272 (1:1000), Phospho-AMPK α (Thr172) (40H9) Rabbit mAb #2535 (1:1000), AMPK α (D5A2) Rabbit mAb #5831 (1:1000), Monoclonal Antibody - SDHA (D6J9M) XP® Rabbit mAb (1:1000), Anti-NOR1 antibody(ab94507) rabbit(1:500), anti-GAPDH (Cell signaling technology, #2118) (1:5000)을 4°C 에 overnight하여 멤브레인과 항체가 충분히 접촉되도록 하였다. 다음날, 4°C 에서 꺼낸 멤브레인을 20여분동안 상온에서 shaking을 하였으며 10분씩 3번을 TBST로 shaking하여 충분히 씻어주었다. 2차 항체는 rabbit peroxidase (1:3000)를 사용하여 상온에서 2시간 동안 멤브레인에 도포 하였다. 다시 3번의 TBST 10분 위상을 거쳐 멤브레인을 Immobilion western chemiluminescent HRP substrate (Millipore, #WBKLS0500)를 이용하여 Nano quant로 이미징 하였다.

제 10 절 Enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA)

본 연구에서는 Serum과 Apelin의 수준을 Enzyme immunoassay 방식으로 분석하였다. 근육 단백질의 경우 얼음 위에서 lysis buffer를 이용하여 근육조직으로부터 추출한 단백질 상층액을 정량 하였고, Serum의 경우 조직 적출 시 심장 채혈법으로 혈액을 채취한 후, K3E tube에 보관하였다. 이 후 충분히 인버팅 해준 후, 5000rpm, 4℃, 15분 동안 원심 분리하여 상층액만 추출하였고 분석시까지 -90℃에 보관하였다. Serum과 단백질 상층액은 96well plate에 분주 하였고 RayBio Human/Mouse/Rat Apelin C-Terminus Enzyme Immunoassay KIT를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 진행하였다. 데이터 분석은 Standard curve를 그리고 결과값의 역수 값을 취해 농도를 구하였다. Kit의 최소 민감도는 15.8ng/ml였다.

제 11 절 IPGTT test

혈중 글루코스 농도의 변화를 측정하기 위해 IPGTT test를 시행하였다. 실험동물은 test실시전 16시간의 금식을 하였다. 실험동물의 몸무게에 따라 글루코스의 주입량을 계산하였으며(2.5g/kg), 글루코스의 농도는 250mg/ml였다. 글루코스 주사시 주사바늘은 쥐의 몸통에 비스듬히 하여 너무 깊게 찌르지 않도록 주의하였다. Test중 혈액 채취는 쥐의 꼬리 끝 부분을 이용하였으며, 혈중 글루코스는 주입 후 0, 30, 60, 120분 단위로 blood glucose meter (Accu-Chek Go; Roche Diagnostic, Mannheim, Germany)를 이용하여 측정하였다.

제 12 절 자료처리

자료 처리는 Graph Pad Prism 7 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA, USA)와 SPSS Version 23 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA)를 이용하여 분석하였다. Data는 $MEAN \pm SEM$ 값으로 표시하였다. 유의수준은 $P < 0.05$ 수준으로 설정하였으며 그룹 간 유의성 비교는 One-way ANOVA, Student Independent t-Test(one tailed, two tailed)의 방법을 이용하였다. One-way ANOVA검정 후 사후검증으로 Dunnett 검정을 실시하였다. 변인간의 상호작용 효과의 유의성 판단은 Two-way ANOVA 분석을 이용하였다.

제 4 장 연구 결과

본 연구는 8주간 고지방 고설탕 식이를 쥐에게 공급하여 비만, 대사이상 상태를 유도한 후 다시 8주동안 식이 제한과 트레드밀 운동을 중재하였다. 이후 대사증후군의 지표인 IPGTT와 혈중 TC, TG의 수준을 분석하고 Nr4a3, Apelin 및 미토콘드리아 기능 관련 분자들의 단백질과 mRNA의 발현 수준을 ELISA와 웨스턴 블랏팅, Real-time PCR기법으로 분석하였다. 아울러 근육 기능의 지표가 되는 Hanging time과 Grip strength를 측정하였다. 연구 결과는 대조군 대비 HFHS의 대사 이상 유도, HFHS대비 운동의 효과, 설탕 제한의 효과 그리고 설탕과 지방의 동시 제한 효과의 비교로 나누어 서술하였다.

제 1 절 운동과 식이 제한이 대사지표에 미치는 영향

본 연구에서 8주간의 운동과 식이 중재 기간 동안 쥐의 몸무게 변화는 다음과 같다. HFHS그룹과 비교할 때 HFHSEX, SR, SREX그룹을 제외한 모든 그룹의 몸무게가 중재시작 2주후부터 유의하게 낮았다. 그래프의 형태를 볼 때, 그룹간 식이에 따라 체중의 변화를 보였으며 ND, NDEX그룹은 대조군 수준으로 몸무게가 회복되었고 운동그룹이 비 운동 그룹보다 몸무게가 적은 경향을 보였다(Figure 2A).

본 연구에서는 당뇨의 정도, 인슐린의 작용능력 등을 관찰하기 위해 실험동물의 글루코스 대사 능력을 Intraperitoneal glucose tolerance test(IPGTT test)를 통해 분석하였다. HFHS그룹과 비교할 때, ND(HFSR), NDEX(HFSR+EX)그룹이 시간(분)에 따라 유의하게 낮은 차이를 보였다. 또한, SREX그룹이 SR그룹보다 30분 이후 전반적으로 낮은 경향을 보였으며 ND와 HFHS그룹에서는 운동에 따른 유의미한 차이가 없었다(Figure 3A and B)

본 연구에서 그룹에 따른 지질대사 이상의 효과를 관찰하기 위하여 실험동물의 혈중 Total cholesterol의 농도 측정을 한 결과 대조군(CON) 대비 HFHS그룹에서 유의하게 혈중 TC수준이 증가한 것을 관찰할 수 있었다. 이는 고지방 고 설탕 식이로 인하여 혈중 TC수준이 유의미하게 변화했음을 의미한다. 그룹간 t-test결과, SREX그룹이 SR그룹보다 유

의미하게 낮은 결과를 보였으며, NDEX그룹이 ND그룹보다 유의하게 낮은 결과가 나타났다. HFHS그룹과 비교할 때에, SR, SREX, ND, NDEX 그룹은 유의미하게 낮은 TC 수준을 보였다(그림 3D). 또한 two way ANOVA 분석 결과 운동과 식이 따라 그룹간 TC의 차이가 유의하였으나 운동과 식이의 상호작용은 유의하지 않았다.

본 연구에서 그룹에 따른 지질대사 이상의 효과를 관찰하기 위하여 혈중 Total Triglyceride(TG)의 수준을 분석한 결과 TC의 결과와 마찬가지로 대조군대비 HFHS그룹에서 유의미하게 증가한 것을 볼 수 있었다. HFHS를 기준으로 비교하였을 때에는 SR, SREX, HFHSEX, ND그룹이 유의미하게 낮은 TG수준을 보였다. 이는 설탕의 제한효과와 지방과 설탕의 동시 제한 효과가 나타났음을 의미한다. 특히 HFHSEX그룹과 SREX그룹의 경우 각각 HFHS그룹과 SR그룹보다 유의미한 감소를 관찰할 수 있어 TG의 감소에 운동에 의한 효과가 관찰되었다(Figure 3E). 또한 two way ANOVA 분석결과 TC와 마찬가지로 운동과 식이에 따라 그룹간 TG 수준의 차이가 있었으나 운동과 식이간의 상호작용은 없었다.

인슐린 신호 전달의 핵심 물질인 pAKT/AKT의 비율을 분석하였다. 그 결과 HFHS그룹 대비 ND그룹에서 그 수준이 유의미하게 증가한 것이 관찰되었다. 이는 고지방, 고설탕 식이를 정상 식이로 바꾸었을 때 pAKT/AKT 수준이 증가한 것을 의미한다(Figure 3C). 또한 대조군(CON)대비 HFHS그룹의 pAKT/AKT비율이 유의미하게 줄어들었다. Two way ANOVA 분석 결과로써 운동에 따른 그룹의 pAKT/AKT비율의 차이는 없었으나, 식이 제한에 따른 차이는 있었다. 운동과 식이의 상호작용은 유의하지 않았다.

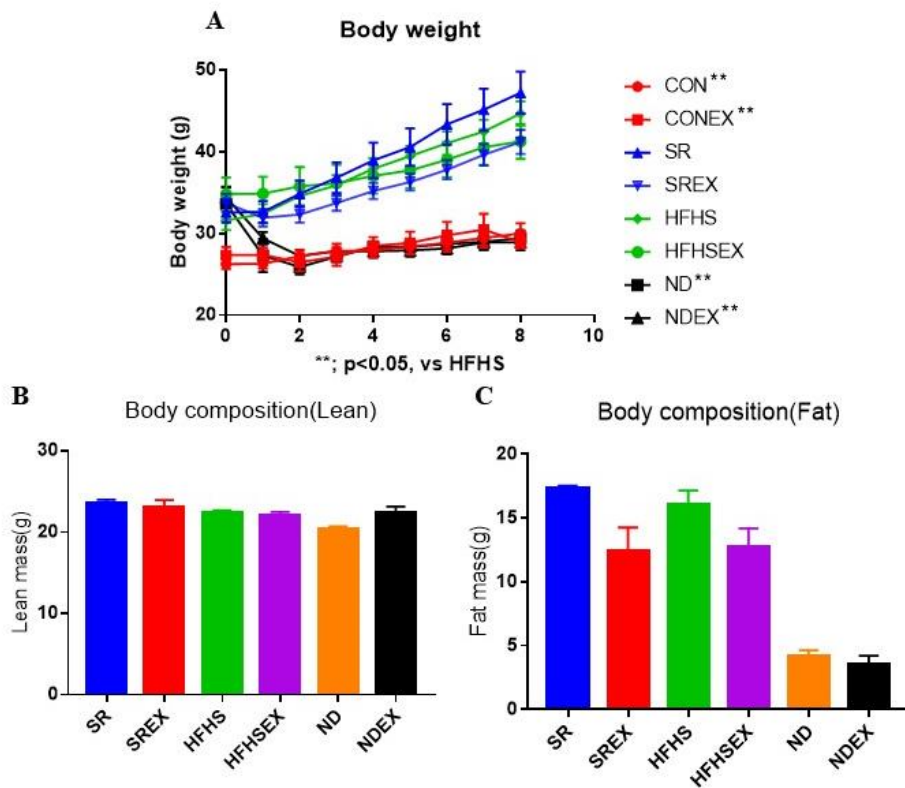


Figure 2. Body weight (A), Body composition – Lean, Fat (B and C). **p<0.05 vs. HFHS after second week of intervention start. Statistical analysis was performed using Two way ANOVA analysis. The data were presented as mean \pm standard error of mean and The statistical significance level was set at p<0.05.

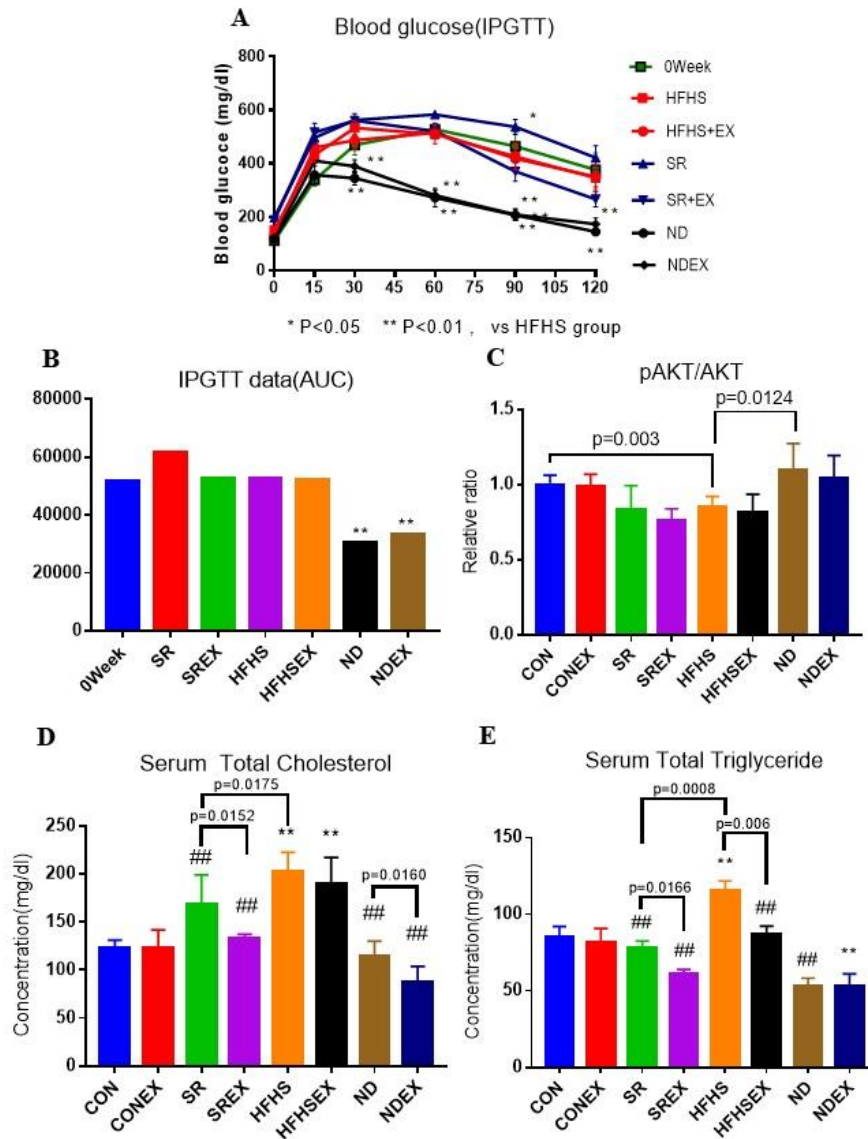


Figure 3. The effect of exercise and diet restriction on metabolic indexes. IPGTT (A), IPGTT-Area under curve (B), pAKT/AKT ratio in skeletal muscle (C), Serum total cholesterol and Total triglyceride level (D and E). **p<0.05 vs. CON, ##p<0.05 vs. HFHS. HFHSR (ND). Statistical analysis was performed using Independent t-test, One way and Two way ANOVA analysis. The data were presented as mean \pm standard error of mean and The statistical significance level was set at p<0.05. 0week; starting week of intervention

제 2 절 Nr4a3 및 Apelin 발현 변화

본 연구에서 운동과 식이 제한에 따라 Nr4a3의 발현 정도를 분석하기 위해 비복근에서의 단백질 분석을 실시하였다. 그 결과 HFHSEX그룹은 HFHS그룹 대비 유의미한 Nr4a3의 발현 수준의 증가가 나타났다. SR그룹의 경우 HFHS그룹 대비 증가하는 경향을 보였으나 유의미하지 않았다. 그러나 다른 그룹에서는 그룹간 유의미한 차이가 나타나지 않았다(Figure 4A). Two way ANOVA 분석결과 식이에 따라 Nr4a3의 발현수준이 그룹 간에 차이가 있었으며 운동과 식이의 상호작용 효과는 유의하지 않았다.

운동자극에 대한 생리적인 반응을 매개하는 분자후보군 중 세포내 물질대사와 연관이 있는 Nr4a3에 대한 mRNA의 수준을 식이 제한과 운동 중재를 한 후 확인하였다. SR, HFHS, ND그룹은 8주간 대사 이상을 유도했던 그룹으로 대조군(CON)과 유의미한 차이가 없었다(Figure 4B).

본 연구에서는 Apelin의 그룹에 따른 단백질 발현양을 확인하기 위해 serum과 비복근에서 Apelin의 발현 수준을 ELISA kit를 이용하여 분석하였다. Serum에서의 Apelin 단백질 수준은 HFHSEX그룹이 HFHS그룹 대비 유의미하게 감소하여 운동에 의한 효과가 나타났다. NDEX그룹 역시 ND그룹에 비해 유의미하게 혈중 Apelin농도가 감소하였다. HFHS그룹 대비 SR그룹에서는 유의 수준에 근접하게 Apelin의 농도 감소가 나타났다(Figure 4D). Two way ANOVA 분석결과 serum apelin 수준에서는 운동의 유무에 따라 그 수준이 그룹간 차이가 있었으나 식이는 유의하지 않았다. 그리고 운동과 식이의 상호작용 효과는 유의미 하였다.

비복근 근육에서의 Apelin 단백질 수준은 운동과 식이 처치 그룹(SR, SREX, HFHS, HFHSEX, ND, NDEX) 사이에서는 나타나지 않았다. 대조군(CON)에 비해 운동과 식이 처치 그룹은 유의미하게 낮은 수준을 보였다(Figure 4C). 비복근에서의 모든 그룹의 Apelin 수준은 1~3ng/ml로, 혈청의 Apelin 수준(1000~4000ng/ml)과 비교했을 때, 그 양이 현저히 적은 것을 관찰할 수 있었다. 이는 Apelin이 근육에서는 그 발현 양이 적으며 근육이나 다른 조직에서 혈청으로 분비되어 기능을 하는 펩타이드인 것을 의미한다. Two way ANOVA 분석결과 근육에서

는 식이에 따른 그룹간 Apelin수준의 차이는 유의미하였으나 운동효과는 없었으며 운동과 식이의 상호작용 효과 또한 유의미하지 않았다.

Real time PCR을 통한 Apelin과 Apelin receptor(APJ)의 mRNA 수준은 그룹간 유의미한 차이가 없었다(Figure 4E, F).

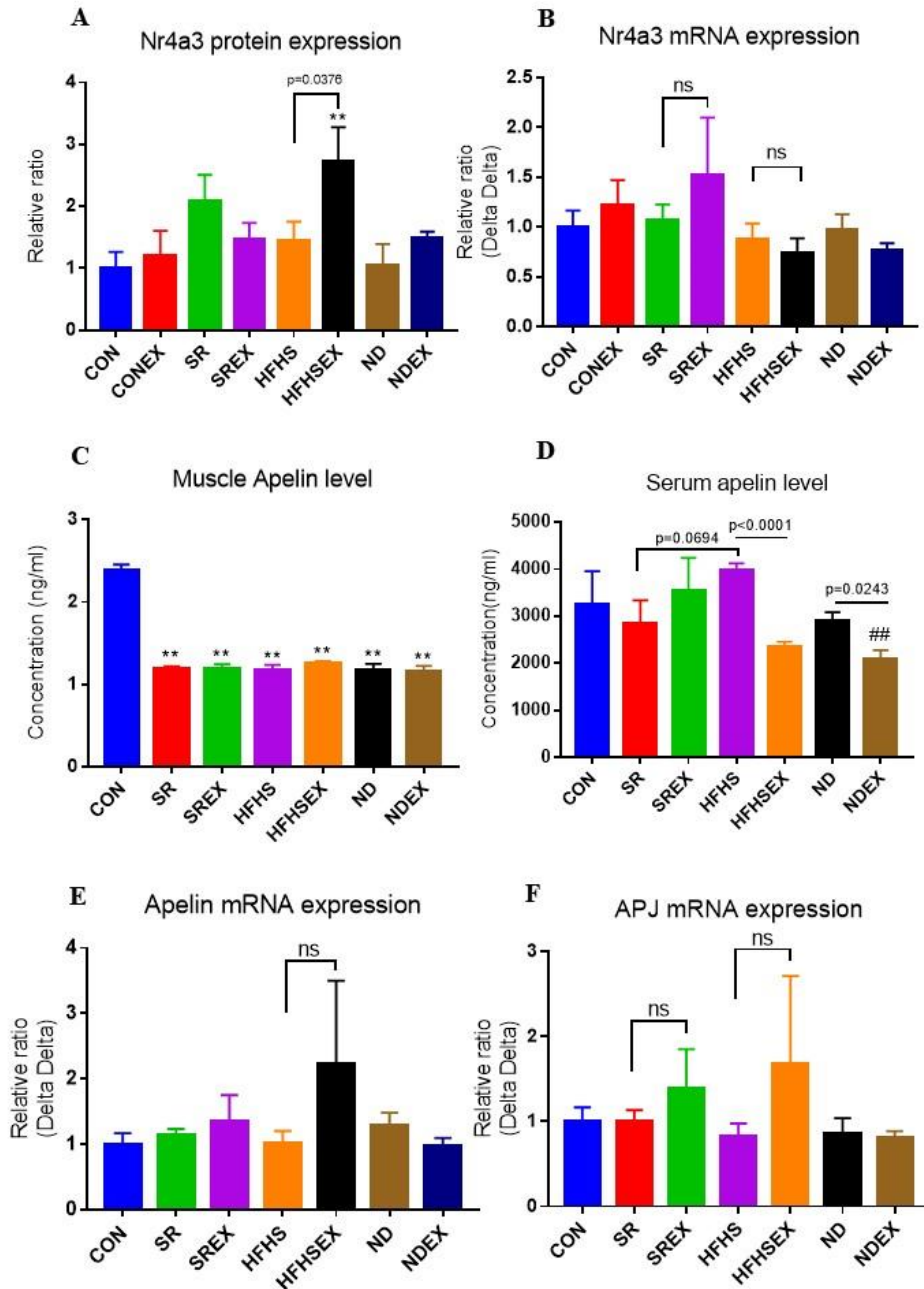


Figure 4. The expression level of Nr4a3 and Apelin. Muscle Nr4a3 protein expression (A), Muscle Nr4a3 mRNA expression (B), Muscle Apelin expression level (C), Serum Apelin level (D), Muscle Apelin mRNA expression (E), Muscle APJ mRNA expression (F). ** $p < 0.05$ vs. CON, ## $p < 0.05$ vs. HFHS. ns; no significant. Statistical analysis was performed using Independent t-test, One way and Two way ANOVA analysis. The data were presented as mean \pm standard error of mean and The statistical significance level was set at $p < 0.05$.

제 3 절 미토콘드리아 기능 관련 분자 마커의 발현 변화

본 연구에서는 미토콘드리아의 기능과 관련 있는 AMPK, PGC1alpha, SDHA의 발현 수준을 분석하였다.

pAMPK/AMPK의 비율은 대조군(CON)대비 CONEX그룹에서 유의미한 증가를 보였다(Figure 5A). HFHS그룹 기준으로는 SR그룹에서 유의미한 감소가 나타났다. 그 밖의 그룹간에는 HFHS그룹 대비 유의미한 차이가 없었다. 운동과 식이가 pAMPK/AMPK에 미치는 영향을 two way ANOVA로 분석한 결과 운동에 따른 그룹간 비율의 차이는 없었으나 식이에 따른 그룹간 비율의 차이는 유의수준에 근접하였다. 운동과 식이의 상호작용 효과는 유의미하지 않았다.

PGC1alpha의 경우 그룹간 t-test(two tailed) 결과 HFHS대비 SR그룹은 유의하게 감소하였다. 또한 HFHSEX그룹은 HFHS그룹대비 유의하게 증가하였다. Two-way ANOVA 분석 결과로써 PGC1alpha의 경우에는 운동과 식이에 따라 발현 수준 값이 유의미한 차이가 나타났으며, 운동과 식이의 상호작용 효과 또한 유의미하였다.

SDHA의 경우 대조군(CON)대비 식이와 운동의 모든 중재 그룹에서 유의미한 발현량의 증가가 관찰되었다. 그러나 HFHS를 기준으로 SR그룹, ND그룹과 각각의 운동 그룹을 비교하였을 때에는 유의미한 차이가 나타나지 않았다. 그 밖에 HFHSEX그룹은 HFHS그룹에 비해 증가하는 경향을 보였다(one tailed t-test). Two way ANOVA분석을 통한 운동과 식이의 상호작용 효과는 유의하지 않았으며, 식이에 따른 SDHA의 발현량의 차이는 유의하게 나타났으나, 운동에 따른 SDHA의 발현의 차이는 유의하게 나타나지 않았다(Figure 5C). 또한, SDHA의 mRNA의 수준에서는 그룹간 유의미한 결과가 도출되지 않았다(Figure 5D).

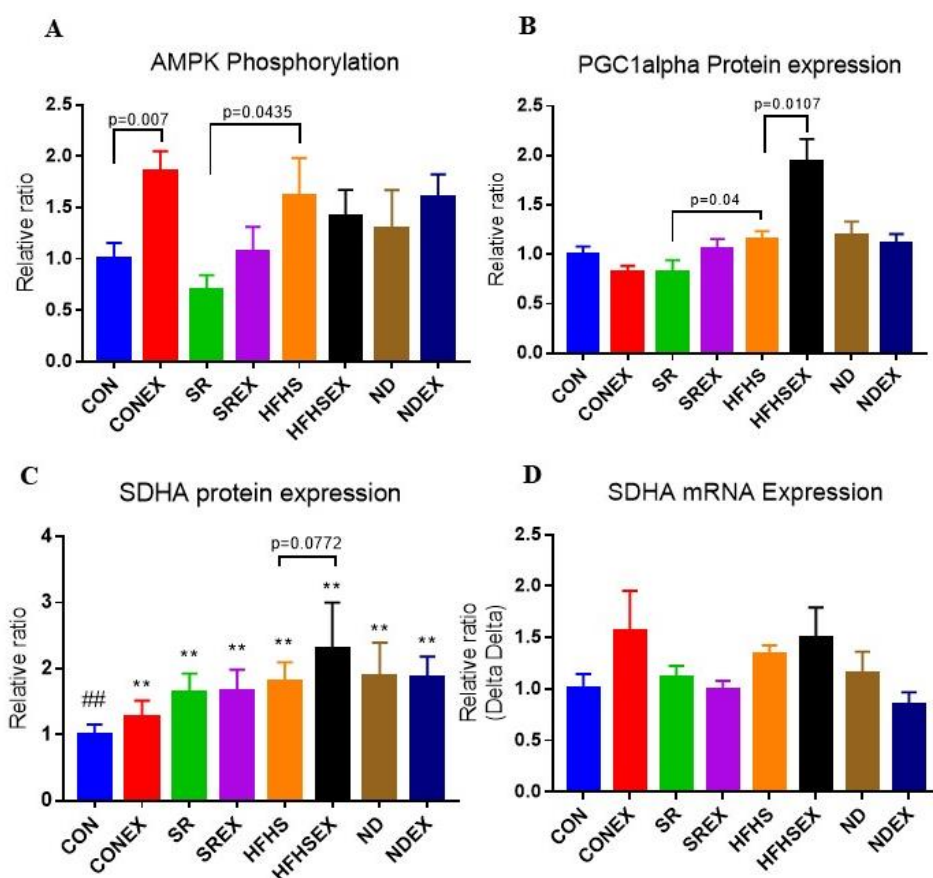


Figure 5. The expression level of Molecular markers of mitochondrial function. Relative ratio of pAMPK/AMPK (A), Muscle PGC1alpha protein expression (B), Muscle Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein variant protein expression (C), Muscle Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein variant mRNA (Deletion of one outlier in HFHSEX group, n=5) (D). **p<0.05 vs. CON, ##p<0.05 vs. HFHS. Statistical analysis was performed using Independent t-test, One way and Two way ANOVA analysis. The data were presented as mean \pm standard error of mean and The statistical significance level was set at p<0.05.

<i>TC, TG, Protein</i>	<i>N/group</i>	Exercise		Diet		Exercise & Diet	
		<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Total Cholesterol	6	11.670	.001	57.786	.000	2.041	.122
Total Triglyceride	6	7.686	.008	21.038	.000	2.180	.105
pAKT/AKT	6	1.408	.242	13.953	.000	.128	.943
Nr4a3	6	1.700	.200	3.273	.031	2.419	.080
Serum Apelin	4	9.029	.006	2.225	.111	3.767	.024
Muscle Apelin	3	.251	.623	265.964	.000	.241	.867
pAMPK/AMPK	6	3.355	.074	2.565	.068	1.374	.265
PGC1alpha	6	4.463	.041	10.968	.000	5.924	.002
SDHA	6	2.729	.106	12.478	.000	1.058	.378

Table 3 Two-way ANOVA analyses testing the influence of exercise, diet and their interactions on metabolic indicators, Nr4a3, Apelin and mitochondrial function molecules in the gastrocnemius muscle and serum. TC; total cholesterol. TG; total triglyceride.

제 4 절 근 기능 관련 변화

비복근의 무게를 그룹별로 분석한 결과 대조군(CON)대비 HFHS그룹의 무게가 유의하게 낮았다($p < 0.05$). 또한 SR그룹은 HFHS그룹대비 유의미한 변화가 없었으며 ND그룹과 NDEX그룹은 HFHS그룹대비 유의하게 증가하였다(Figure 6A).

근육의 기능적인 표현형의 변화를 측정하기 위해 Grip strength test를 실시하였다. 대조군(0Week)에 비해 SR, HFHS, HFHSEX그룹이 유의미하게 감소하였다. 또한 HFHS그룹을 기준으로 그룹간 차이를 비교해 보았을 때에 ND, NDEX그룹에서 유의하게 증가한 것을 볼 수 있었으며, SREX그룹은 SR그룹 대비 유의미하게 증가하여 운동의 효과가 나타났다(Figure 6B).

근육의 기능적인 표현형의 변화를 측정하기 위해 Hanging test를 실시하였다. HFHS를 기준으로 NDEX그룹에서 유의하게 증가한 것이 관찰되었다. 대조군(0week)에 비해 SR, HFHS의 그룹은 유의미하게 감소하였고 각 군에서 운동 처치를 한 그룹이 유의미하게 높을 수준을 보였다. 이는 식이와 운동의 효과가 나타났다고 할 수 있다. 특히 NDEX그룹의 경우 HFHS에 비해 유의미하게 증가하였다(Figure 6C).

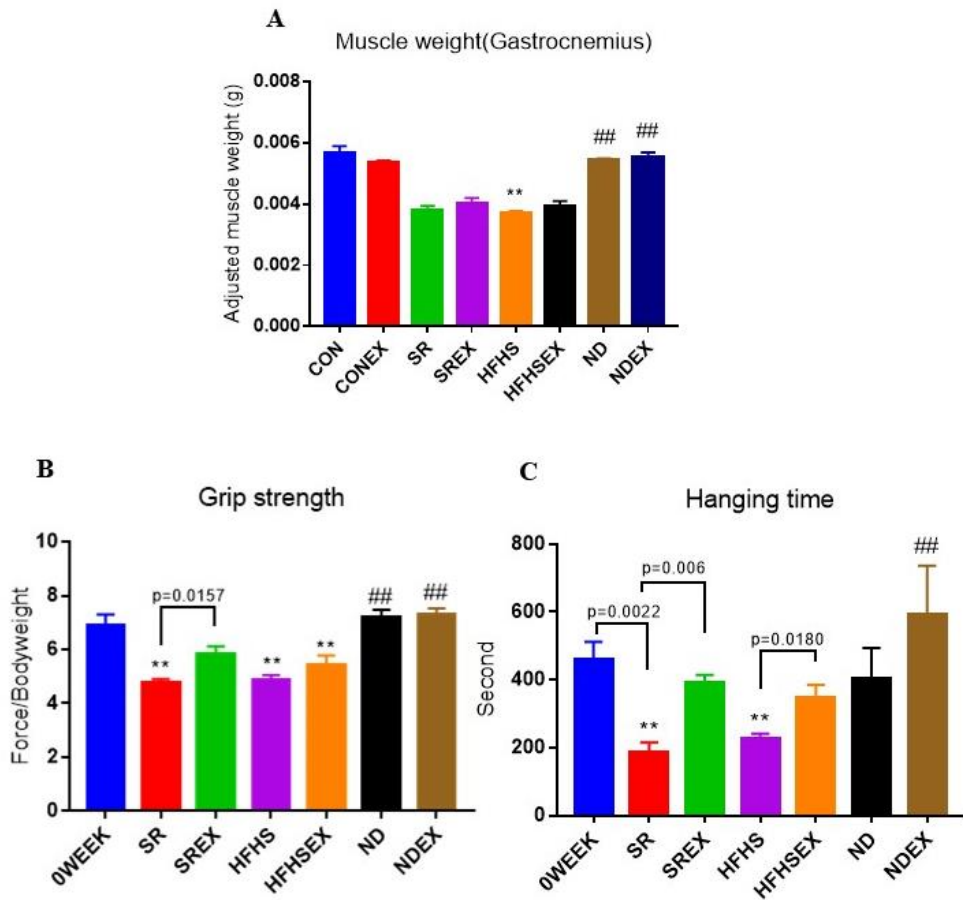


Figure 6. The muscle function indicators. Gastrocnemius muscle wet weight (A), Grip strength (B), Hanging time (C). ** $p < 0.05$ vs. CON, ## $p < 0.05$ vs. HFHS. 0week; starting week of intervention. Statistical analysis was performed using Independent t-test, One way ANOVA analysis. The data were presented as mean \pm standard error of mean and The statistical significance level was set at $p < 0.05$.

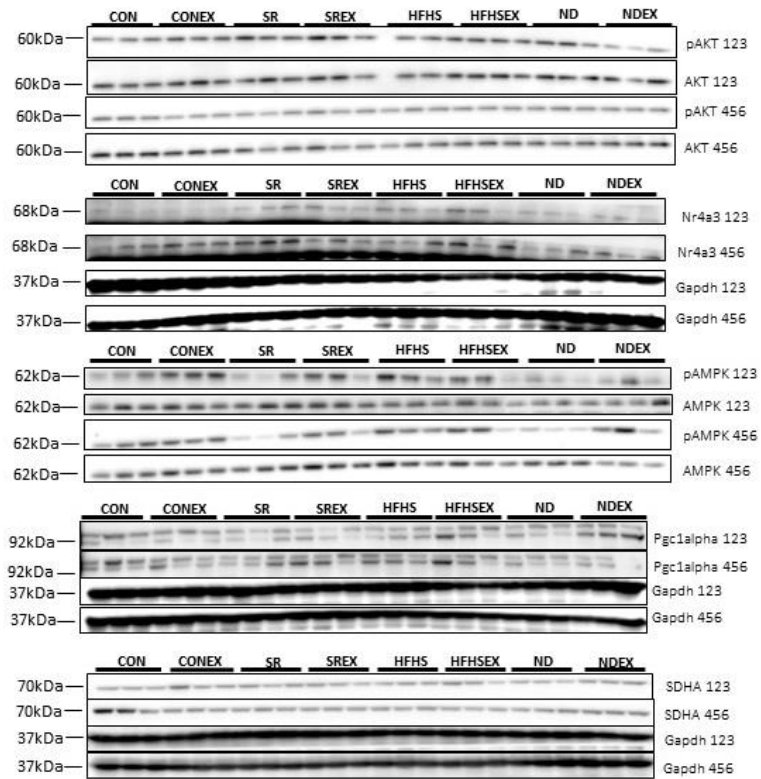


Figure 7. Western blot image. The number next to molecule name represent the sample number(n=6). Quantification of western blots were shown in Figure 3, 4, 5, 6.

제 5 장 논 의

본 연구에서는 수컷 C57BL/6를 대상으로 8주간의 고 지방, 고 설탕 식이를 통해 대사이상을 유도한 후, 다시 8주간의 운동 처치와 식이 처치를 함으로써 대사지표 및 Nr4a3, Apelin의 발현수준, 미토콘드리아 기능관련 단백질 및 mRNA의 수준을 확인하였다. 이를 통해 식이와 운동 처치가 각각의 분자와 지표들에 어떻게 영향을 미치는지 분석하고자 하였다. Nr4a3와 관련한 최근의 연구는 일회성운동 자극과 정상 생리 상태에서의 분석이 주를 이루었고(Mey, Solomon, Kirwan, & Haus, 2019), 대사이상 상태에서 운동과 식이 제한에 따른 발현을 분석한 연구는 부족한 실정이다. Apelin 또한 대사와 노화와 관련하여 그 역할이 계속해서 주목되고 있는 상황이다(Bertrand, Valet, & Castan-Laurell, 2015; Cong, Wei, & Ji, 2015; Vinel et al., 2018). 그리고 본 연구에서 사용된 비복근은 발바닥 굴근으로써 트레드밀 운동 동작에 쓰일 수 있는 근육이다(Staron et al., 1999). 또한 glycolytic 섬유 타입의 비중이 높은 근육으로써, 고지방, 고설탕 식이에 민감도가 높은 근육이라고 할 수 있어(Collins et al., 2017; Sher & Cardasis, 1976) 비복근을 마우스 트레드밀 운동의 주동근 중 하나로써 분석하고자 하였다.

제 1 절 운동과 식이 제한이 대사지표 및 몸무게, 근육기능 등에 미치는 영향

본 연구에서는 8주간의 운동과 식이 처치에 따른 대사 이상의 효과를 확인하기 위해 Body weight, IPGTT, 혈중 TC, TG 수준을 분석하였다. 혈중 Total triglyceride의 경우 대조군 그룹의 평균이 77.70mg/dl 수준으로 관찰되었으며, Total cholesterol의 경우 HFHS그룹에서 200mg/dl로 나타나 기존 선행연구에서 관찰된 TC, TG 수준과 비슷한 결과를 보였다(Ali et al., 2014; Guo, Jou, Gavrilova, & Hall, 2009; Schreyer, Wilson, & LeBoeuf, 1998). 또한 혈중 TC와 TG 분석 모두에서 SR그룹이 HFHS그룹 대비 유의미하게 감소하였으며 식이 제한 그룹에서 운동의 효과가 나타났다. 이는 설탕의 단독 제한과 운동이 혈중 TC, TG의 개선에 긍정적인 역할을 할 수 있다는 것을 의미한다. 결론적으로 8주간의 대사이상 유도는 몸무게의 유의미한 증가와 혈중 TC, TG

수준의 유의미한 증가를 가져와 대사 이상을 유도하였다고 할 수 있으며 설당의 단독 제한과 운동은 혈중 TC와 TG의 개선에 긍정적인 역할을 한다고 할 수 있다.

본 연구에서 활용된 GTT 측정은 임상에서 제 2형 당뇨병나 글루코스 관련 대사 이상을 가진 사람에게 활용되는 측정 방법이며 쥐를 대상으로는 IPGTT가 OGTT보다 빈번하게 활용된다(Andrikopoulos, Blair, Deluca, Fam, & Proietto, 2008). 그 결과로써, 시간에 따른 혈중 글루코스의 수준은 HFHS그룹을 기준으로 운동과 식이를 모두 처치한 그룹인 ND와 NDEX그룹에서 유의미하게 낮은 수치가 관찰되어 그 효과가 나타났다(Figure 3A). 그러나 SR 그룹은 HFHS그룹과 유의미한 차이가 관찰되지 않았는데 이는 비록 설당의 제한은 있었으나 고지방 식이는 그대로 유지하였기 때문으로 사료된다. 따라서 지방을 제거하지 않은 상황에서 설당의 단독 제한은 혈중 글루코스 개선에 효과가 없다고 할 수 있다. 그리고 본 연구의 HFHS그룹의 IPGTT수치와 선행연구의 수치가 비슷한 것을 볼 때(Schreyer et al., 1998), 고지방, 고설당 식이에 의한 글루코스 대사 이상 유도가 적절 했다고 사료된다.

인슐린 신호 전달의 중요 분자 중의 하나인 pAKT/AKT의 수준은 대조군(CON)대비 HFHS그룹에서 유의미한 감소가 나타났고 이는 기존의 연구와 같은 경향을 나타낸다(Ferretti et al., 2018; Y. Liu et al., 2017). HFHS그룹 대비 ND그룹에서는 AKT의 인산화 형태가 유의미한 증가를 보여 IPGTT결과와 함께 판단하였을 때, 식이 제한이 인슐린 저항성 개선에 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다.

한편 근 지구력은 미토콘드리아의 능력과 밀접한 관련이 있다. Lundby and Jacobs (2016)에 따르면 근육의 미토콘드리아 양은 근육의 비대정도와 유산소성 능력과 정적인 상관관계가 있다고 보고하였다. 본 연구에서는 근지구력 평가를 위해 Hanging test를 실시하였고 Grip strength의 경우 근력 수준을 평가하는데 이용하였다.

Hanging test에서는 고지방, 고설당 식이에 의한 기록의 감소와 운동에 의한 기록의 증가가 나타났다. 또한 식이 제한과 운동을 동시에 처치한 NDEX그룹에서의 기록이 HFHS대비 가장 높았다. Grip strength의 경우에서도 ND와 NDEX 그룹이 HFHS그룹대비 가장 높은 수치를 보였고 HFHS와 SR그룹에서 기록의 감소가 나타났다. 운동의 효과는 SREX 그룹에서만 나타났다. 이러한 결과는 고지방, 고설당 식이가 근지구력과 근력과 같은 근 질에 좋지 않은 영향을 줄 수 있다는 것을 의미하며 운동에 의해 개선될 수 있음을 의미한다. 실제, 본 연구에서 측정한 근육

의 무게 또한 HFHS그룹과 SR그룹이 대조군에 비해 낮은 것으로 나타나(Figure 6A), 이러한 근육 기능 표현형 결과를 뒷받침해 줄 수 있다고 사료된다.

제 2 절 Nr4a3 및 Apelin 발현 수준 확인

기존의 연구에서는, mRNA 수준에서 Nr4a3를 분석한 연구가 대부분이며 일회성 운동 후의 수준을 분석한 연구가 주된 연구였다(Goode et al., 2016; Kawasaki et al., 2009; Mahoney et al., 2005; Pattamaprapanont et al., 2016). 이들 연구에서는 사람과 쥐의 근육에서 단기적 일회성 유산소 운동후에 주동근에서 Nr4a3의 mRNA의 수준이 증가한다고 보고하였다. 이러한 증가는 기계적인 자극에 의한 칼슘 신호 전달에 의해 유도되고(Goode et al., 2016), 일정 부분은 AMPK의 활성화에 의해 Nr4a3의 발현이 조절된다고 보고된 바 있다(Kawasaki et al., 2009). 본 연구의 단백질 수준에서는 HFHS그룹을 제외하고는 운동에 의해 Nr4a3 수준의 유의미한 증가가 나타나지 않았다. 이러한 사실은 단백질 수준에서 분석한 다른 선행 연구와 일치하는데, 하루 3시간 3주의 트레드밀과 자발적 wheel running 운동 결과 쥐의 가자미근에서 Nr4a3 수준이 증가하지 않았다(Kawasaki et al., 2011). 본 연구에서도 Nr4a3의 수준이 CON과 CONEX그룹간 유사한 발현양상이 나타난 것을 확인하였다. 그러나 HFHS그룹에서는 8주간의 운동처치시 유의미한 증가가 나타나 운동의 효과가 나타난 것으로 판단된다.

여기서 중요한점은 Nr4a 수용체의 동형단백질이 글루코스와 지방 대사에서 역할을 할 수 있고(Ranhotra, 2015), 특히 Nr4a3의 경우 세포의 글루코스와 지방산의 이용(Kawasaki et al., 2009; Pearen et al., 2006)과 관련이 있다는 사실이다. 본 연구에서 증가된 혈중 TG, TC, 글루코스 수준이 HFHS그룹에서 관찰되었으므로, 이러한 기질의 이용률을 높이기 위한 Nr4a3의 역할의 증대가 있으리라고 생각된다. 따라서 운동에 의해 높아진 Nr4a3수준은 잠재적으로 이러한 글루코스와 지질의 비 이상적인 증가 상태에서 구체적으로 어떠한 역할을 할 수 있는지 기전적인 연구가 더 필요하며 CON과 HFHS그룹이 서로 다른 운동에 대한 반응을 살펴볼 때, 정상적인 생리 상태와 대사 이상 상태에서의 Nr4a3단백질의 turnover rate에 대한 분석이 필요 하다고 사료된다.

한편 최근의 Mey et al. (2019)의 연구에서는 인슐린 자극에 의해 유

도되는 Nr4a2와 Nr4a3의 단백질 발현이 비만과 제 2형당뇨를 가지고 있는 사람에게서 유의하게 낮아졌다고 보고하였다. 이밖에 Nr4a3가 글루코스과 인슐린 대사에서 중요한 역할을 할 수 있고(Fu et al., 2007; Goode et al., 2016), 본 연구의 HFHS 상태에서 운동에 의해 Nr4a3의 발현이 증가되었다는 사실을 종합해 볼 때, 고지방, 고 설탕 상태에서 운동에 의해 증가한 Nr4a3가 글루코스 대사 관련 역할을 할 수 있으리라 판단된다. 그러나 아직 대사 이상 질환에서의 Nr4a3의 발현 수준에 대한 연구가 절대적으로 부족함으로 일반화하기에는 무리가 있다고 생각된다. 따라서 추후 연구에서는 현재 Nr4a3관련 부족한 선행 연구를 뒷받침하기 위하여 지방산이나 글루코스의 수준에 따른 Nr4a3의 단백질 발현이 연구되어야 하며 특히 다양한 대사 이상상태에서의 Nr4a3의 발현 또한 심화된 연구가 필요하다. 또한 Nr4a3의 mRNA수준에서는 유의미한 변화가 관찰되지 않아, 전사 후 번역 조절, 단백질 자체의 반감기 등을 복합적으로 고려할 필요가 있다(Greenbaum, Colangelo, Williams, & Gerstein, 2003).

Apelin의 경우 비복근에서는 발현양이 유의한 차이는 없었으나, 대조군(CON)대비 고지방, 고설탕 그룹에서 유의하게 감소하였다. 혈청의 Apelin은 그룹에 따라 운동과 식이에 의한 유의한 변화가 확인되었다. 이는 Apelin이 운동에 의해 혈중으로 분비되어 다른 기관에 작용할 수 있으므로(Vinel et al., 2018), 혈청의 Apelin 수치가 대사에서 중요한 역할을 할 수 있다는 또 하나의 근거가 될 수 있다. 또한 Apelin은 대사 질환 환자의 혈청에서 그 수준이 높게 존재하다가 운동시에 감소한다는 선행 연구 결과가 있는데(Noori-Zadeh, Bakhtiyari, Khanjari, Haghani, & Darabi, 2019), 본 연구 결과에서도 HFHS, ND그룹에서 일치한 결과가 나타났다. 이러한 감소된 혈중 Apelin의 농도는 대사 이상 상태에서 생리적 보상작용에 의해 증가된 Apelin수준이 다시 정상으로 돌아왔다는 의미이다(Krist et al., 2013). 비만인에서 증가된 혈중 Apelin 수준이 비 정상적인 Insulin, HOMA-IR, TG등의 수치와 관련이 있다는 사실을 볼 때(Ba et al., 2014), 이러한 Apelin의 정상적 수준의 회복은 대사질환의 개선에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

또한 HFHS그룹대비 SR그룹에서 유의수준에 근접한($p=0.0694$)결과가 나타났고 이는 설탕제한이 일정부분 혈중 Apelin의 감소에 기여한다고 할 수 있다. 그러나 좀더 유의미한 결과를 나타내기 위해서는 고지방식이 없이 설탕의 효과만 보는 그룹 설정이 추가로 필요하다고 판단된다.

Apelin에 대한 운동 자극의 효과를 볼 때, 설탕을 제한하고 고지방 식

이 만 공급한 그룹(SR)에서는 유의하지는 않았으나 다른 그룹과 반대의 결과가 나타났다. 이는 고지방 식이가 그대로 유지되었을 때, 운동 처치 효과가 나타나지 않았음을 의미한다. 본 연구에서는 개체의 먹이 섭취량을 제한하지 않았기 때문에 설탕 제한에 따른 고지방 식이의 추가 섭취 등의 부정적인 영향을 고려해야 된다고 판단된다.

제 3 절 미토콘드리아 기능 관련 분자의 발현 수준 변화

Hanging test를 통한 연구결과, 근육의 지구성능력과 미토콘드리아 기능은 정적인 관련성이 있으며 근육 기능의 중요한 지표임과 동시에 AMPK-PGC1alpha를 통해 조절된다(Chen et al., 2017). 본 연구에서도 미토콘드리아의 기능 관련 지표인 pAMPK/AMPK 비율과 PGC1alpha의 발현 그리고 미토콘드리아의 활성화와 관련이 있는 SDHA의 발현을 운동과 식이 그룹에 따라 비교 분석하였다.

pAMPK/AMPK 수준은 대조군(CON)에서 기존의 선행연구에서 알려진 바와 같이 운동 그룹(CONEX)에서 그 발현 수준이 증가하였다. HFHS그룹을 비롯하여 SR, ND그룹에서는 유의한 운동의 효과가 나타나지 않았는데, 이는 고지방, 고설탕 식이로 인한 대사이상인 AMPK의 인산화 수준에 영향을 미쳤을 가능성이 있다. 또한 Jain et al. (2014)에 의하면 설치류에서 고지방, 고설탕 식이에 의해 증가된 mtDNA와 미토콘드리아의 전자전달계 단백질 그리고 증가된 pAMPK의 수준이 CaMKII에 의해 조절된다고 보고되었고, Fillmore, Jacobs, Mills, Winder, and Hancock (2010)의 연구에서는 설치류에서 고지방 식이에 의해 pAMPK의 수준이 증가되었다. 본 연구에서도 유의하지는 않았으나 증가된 경향의 pAMPK의 수준이 관찰되었다. 직접적인 AMPK의 활성화가 제 2형당뇨의 증상을 완화시키고 근육세포의 글루코스 이용을 증가시킨다는 연구와 함께(Herzig & Shaw, 2018), AMPK의 활성화가 ATP생성의 증가, 미토콘드리아의 항상성 유지와 관련이 있으므로(Herzig & Shaw, 2018), 본 연구의 결과는 장기간(16주)의 고지방, 고설탕 식이로 인해 비복근의 지질 및 글루코스의 이용률이 감소되는 것에 대한 생리적인 보상작용의 결과라고 판단된다. 한편 증가된 pAMPK 수준은 HFHS 그룹 대비 SR그룹에서 유의미하게 감소되어 대조군(CON) 수준을 회복하였다. 이는 본 연구의 혈중 TG분석 결과 AMPK의 활성화인자인 혈중 지방산이 SR그룹에서 감소된 결과에 의해 그 원인이 일부 설

명될 수 있으며(Fillmore et al., 2010), 설탕 제한의 효과가 일반적인 생리상태에서의 pAMPK의 수준으로 회복하는데 영향을 미쳐 생리적 항상성에 긍정적인 영향을 미칠 수 있다고 사료된다. 그러나 앞서 언급하였듯이 고지방 식이가 그대로 유지되었고 실제적인 미토콘드리아의 양과 기능에 대한 추가 실험을 통해 좀 더 심층적으로 분석되어야 할 필요성이 있다.

미토콘드리아 기능 및 생합성과 직접적인 관련이 있는 PGC1alpha의 경우(Scarpulla, Vega, & Kelly, 2012), pAMPK/AMPK의 비율에서 나타난 차이와는 달리 대조군(CON)과 운동그룹(CONEX)과의 비교에서는 유의한 차이가 나타나지 않았다. 기존의 연구에서는 AMPK가 PGC1alpha의 인산화를 유도하여(Jager, Handschin, St-Pierre, & Spiegelman, 2007), 운동자극에 의해 pAMPK의 수준과 PGC1alpha의 수준이 함께 증가할 수도 있지만, pAMPK 수준의 증가와는 달리 PGC1alpha에서는 유의미한 변화가 없다는 보고도 있어(Li et al., 2011) 증가된 pAMPK 수준이 반드시 PGC1alpha의 발현의 증가를 유도하지는 않는다고 사료된다.

HFHSEX그룹은 HFHS대비 유의미하게 증가하여 운동의 효과가 나타났다($p=0.0107$). 이러한 결과는 본 연구에서 HFHSEX그룹에서 증가한 Nr4a3의 결과와 일치하는데, 운동을 통한 Nr4a3의 증가가 PGC1alpha와 정적인 상관관계를 보인다고 사료된다. 아직까지 Nr4a3와 PGC1alpha와의 관계를 연구한 선행연구는 전무하여 그 구체적인 관계를 심층 연구할 필요가 있다.

고지방, 고설탕 식이가 PGC1alpha에 미치는 영향은 아직 그 의견이 분분하다. 본 연구에서는 식이에 따른 효과로써 대조군(CON)과 HFHS 그룹간에는 유의미한 차이가 없었다. 최근 고지방 식이에 의해 감소된 PGC1alpha의 mRNA와 단백질 수준이 보고되었고(Martins et al., 2018), Sparks et al. (2005)의 연구에서도 3주간의 고지방 식이 처치 후 PGC1alpha mRNA 수준이 대조군 대비 90%가까이 감소되었다. 그러나 또 다른 연구에서는 4주간의 고지방식이 결과 근육의 PGC1alpha의 단백질 수준이 정상식이 쥐와 비교하였을 때 유의미하게 증가한 것이 보고되어(Hancock et al., 2008), 고지방, 고설탕 식이의 구성 비율과 공급 기간에 따라 PGC1alpha의 발현의 차이가 있다고 사료된다.

또한 HFHS그룹 대비 SR그룹은 그 발현이 유의하게 감소하여($p=0.04$), pAMPK/AMPK의 비율과 같은 경향성이 나타났다. 이러한 8주간의 설탕의 제한효과가 PGC1alpha의 감소에 미치는 영향은 본 연구

의 pAMPK의 감소에 의해 일정부분 설명될 수 있고, 역시 대조군 수준으로 감소하여 생리적 항상성에 설탕제한이 기여했을 것이라 생각된다. 실제, 본 연구에서는 HFHS그룹에서 설탕제거시 TG, TC 수준은 유의미하게 감소하는 효과가 나타났고 혈중 apelin의 수준도 감소하는 경향이 나타나 설탕제한의 생리적인 효과가 있다고 판단된다. 그러나 개체의 몸무게와 근육의 무게, 운동 표현형의 결과 등 다른 표현형에서는 SR그룹이 HFHS그룹 대비 개선의 효과가 보이지 않았기 때문에 남아있는 고지방 식이가 본 연구 결과의 한계점으로 지적된다.

미토콘드리아의 산화성 능력과 관계 있고 전자전달계의 complex II의 구성성분을 이루고 있는 SDHA의 단백질 수준의 경우 대조군(CON)대비 HFHS그룹이 유의하게 증가하였다. 이는 제 2형 당뇨병과 비만, 운동 조건에서 그 수준이 증가한 선행연구와 일치한다(Srisawat, Shepherd, Lisboa, & Burniston, 2017). db/db 마우스를 대상으로 한Holmstrom, Iglesias-Gutierrez, Zierath, and Garcia-Roves (2012)의 연구에서도 EDL muscle에서 SDHA의 수준이 증가된 것이 보고되어 본 연구의 대사 이상 상황에서의 SDHA 활성 증가는 미토콘드리아의 산화적 능력의 향상과 맞물려 대사 이상을 경감시키는데 긍정적인 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 본 연구의 HFHSEX그룹과 CONEX그룹이 각각 HFHS, CON대비 운동에 의해 증가하는 경향성을 보여 이러한 운동의 효과는 미토콘드리아의 산화성 능력의 증대를 통해 고지방, 고설탕 식이 대사 이상 상태에 기여를 할 수 있으리라 판단된다. SDHA의 mRNA 수준에서는 그룹간 유의한 변화가 관찰되지 않았는데, Collins et al. (2017)에서는 12주의 고지방, 고설탕 식이 처치가 가자미근에서 SDHA의 mRNA 수준에서 대조군대비 변화가 없었다. 이를 근육의 초기 적응 효과로 해석하고 있는데, MHCI에서 MHCIIa로의 근육타입의 변화, 가자미근의 높은 산화능력에 따른 보상효과 등으로 해석하고 있다. 따라서 본 연구에서도 비복근의 근육타입의 변화와 SDHA의 직접적인 활성도의 확인이 필요하다고 판단된다.

제 6 장 결론 및 제언

본 연구에서는 C57BL/6쥐에게 8주간 고지방, 고설탕 식이를 공급하여 대사이상을 유도하고, 이후 8주간 설탕제한과 설탕과 지방의 제한 그리고 운동 처치 실행에 따른 Nr4a3와 Apelin 및 미토콘드리아 기능과 관련한 단백질 및 mRNA 수준에 미치는 영향을 규명하였다. 나아가 지질 대사 및 GTT 등의 대사지표 결과에 운동과 식이 제한이 미치는 효과에 대하여 분석하였고 다음과 같은 결과를 얻었다.

제 1 절 결론

첫째, 대사지표의 변화.

8주간의 설탕제한은 몸무게, 혈중 TC, TG의 감소에 효과가 있었다.
8주간의 설탕과 지방의 제한은 몸무게, IPGTT, 혈중 TC, TG감소에 효과가 있었다.
그리고 8주간의 운동 처치는 혈중 TC(SREX, NDEX)와 TG의 감소(SREX, HFHSEX)에 효과가 있었다.
pAKT/AKT 수치는 HFHS에서 유의하게 감소, 고 지방, 고 설탕 제거 시 유의하게 증가하였다.

둘째, Nr4a3와 Apelin발현의 변화.

8주간의 설탕제한은 Serum apelin의 유의미한 감소를 유도하였다.
8주간의 운동 처치는 HFHSEX그룹에서 Nr4a3의 유의미한 발현을 유도하였다.
그리고 8주간의 운동 처치는 Serum apelin의 유의미한 감소를 유도하였다(HFHSEX, NDEX).

셋째, 미토콘드리아 기능 관련 분자 마커의 변화.

8주간의 설탕제한은 pAMPK/AMPK비율을 유의미하게 감소시켜 대조군 수준을 회복하였다.
8주간의 설탕제한은 유의미한 PGC1alpha의 수준의 감소를 유도하였다.

그리고 8주간의 운동 처치에 의해 SDHA의 발현의 증가 경향성이 나타났으며(HFHSEX), PGC1alpha의 증가가 유도되었다(HFHSEX).

넷째, 근육의 무게 및 근육기능 지표의 변화.

8주간의 설탕과 지방의 제한은 Hanging time과 Grip strength의 긍정적인 개선 효과가 있었다.

8주간의 설탕과 지방의 제한은 비복근 근육의 무게의 유의미한 증가를 유도하였다.

그리고 8주간의 운동 처치는 Hanging time(SREX, HFHSEX, NDEX), Grip strength(SREX)의 개선을 유도하였다.

이상의 결과를 바탕으로 고 지방, 고 설탕 식이는 대사이상을 유발하였고, 8주간의 설탕제한, 설탕과 지방제한, 운동 처치는 대사지표의 개선과 근 기능 향상, pAKT/AKT의 수준의 증가에 기여할 수 있다. 또한 운동은 고지방, 고설탕 식이로 인한 대사 이상 상태에서 Nr4a3의 발현을 증가시키고 증가된 Serum apelin의 수치를 감소시킬 수 있으며 SDHA와 PGC1alpha의 수준의 증가를 유도하여 미토콘드리아의 활성의 증가에 기여할 수 있다고 사료된다. 아울러 고지방 식이가 유지된 상태에서 설탕의 단독 제한 처치에 의해 pAMPK/AMPK, PGC1alpha의 수준이 대조군(CON) 수준으로 유의미하게 감소되었다.

제 2절 제언

본 연구를 바탕으로 후속 연구에서 고려해야 할 사항을 제안하면 다음과 같다.

첫째, 본 연구는 운동과 식이 제한 처치 후 대사 이상에서 운동 처치시 증가된 Nr4a3와 감소된 serum apelin의 수준을 분석한 연구로써 이러한 결과가 대사 이상의 회복과 관련하여 어떠한 구체적인 역할을 할 수 있는지 그 인과 관계를 확인할 수 있는 분자 메커니즘적 탐구가 추가로 필요하며 궁극적으로 사람 대상에서 이 분자들이 운동과 식이 처치에 따라 미토콘드리아의 기능 및 지질대사, 탄수화물 대사 등에 어떠한 영향을 끼칠 수 있는지 연구되어야 할 필요성이 있다.

둘째, 본 연구에서는 식이 제한 처치에 있어 설탕의 제한과 고지방과 설탕의 동시 제한을 하는 그룹을 설정하였다. 따라서 설탕과 지방의 단일 제거 효과를 보기에 불충분하다고 판단되므로 각각의 단일 효과를 분석하기 위한 추가적인 그룹설정이 필요하다.

셋째, 대사 지표 및 Nr4a3와 Apelin등의 분자에 대한 트레드밀 운동의 효과를 높이기 위해선 1시간, 12m/min, 12° 의 중 강도 수준보다 좀 더 높은 강도와 장 기간의 운동 설정을 할 필요가 있다고 사료된다.

넷째, 본 연구에서는 Nr4a3와 Apelin이 미토콘드리아의 기능과 양 등과 관련하여 어떠한 인과 관계가 있는지 분석하지 못하였다. 따라서 식이 처치 별, 운동 유형별로 변화하는 Nr4a3와 Apelin의 발현이 미토콘드리아의 기능과 양 구체적인 활성화 등에 어떠한 영향을 미칠 수 있는지 미토콘드리아의 생합성, 막 전위 변화, 산화성 효소와 단백질의 활성화 등을 검증할 추가 실험이 필요하다.

참고 문헌

- Ali, K., Abo-Ali, E. M., Kabir, M. D., Riggins, B., Nguy, S., Li, L., Srivastava, U., & Thinn, S. M. (2014). A Western-fed diet increases plasma HDL and LDL-cholesterol levels in apoD^{-/-} mice. *PLoS One*, 9(12), e115744. doi:10.1371/journal.pone.0115744
- Anderssen, S. A., Carroll, S., Urdal, P., & Holme, I. (2007). Combined diet and exercise intervention reverses the metabolic syndrome in middle-aged males: results from the Oslo Diet and Exercise Study. *Scand J Med Sci Sports*, 17(6), 687-695. doi:10.1111/j.1600-0838.2006.00631.x
- Andrikopoulos, S., Blair, A. R., Deluca, N., Fam, B. C., & Proietto, J. (2008). Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295(6), E1323-1332. doi:10.1152/ajpendo.90617.2008
- Asrih, M., & Jornayvaz, F. R. (2015). Metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease: Is insulin resistance the link? *Molecular and Cellular Endocrinology*, 418, 55-65. doi:10.1016/j.mce.2015.02.018
- Ba, H. J., Chen, H. S., Su, Z., Du, M. L., Chen, Q. L., Li, Y. H., & Ma, H. M. (2014). Associations between serum apelin-12 levels and obesity-related markers in Chinese children. *PLoS One*, 9(1), e86577. doi:10.1371/journal.pone.0086577
- Bertrand, C., Valet, P., & Castan-Laurell, I. (2015). Apelin and energy metabolism. *Front Physiol*, 6, 115. doi:10.3389/fphys.2015.00115
- Besse-Patin, A., Montastier, E., Vinel, C., Castan-Laurell, I., Louche, K., Dray, C., Daviaud, D., Mir, L., Marques, M. A., Thalamas, C., Valet, P., Langin, D., Moro, C., & Viguerie, N. (2014). Effect of endurance training on skeletal muscle myokine expression in obese men: identification of apelin as a novel myokine. *Int J Obes (Lond)*, 38(5), 707-713. doi:10.1038/ijo.2013.158
- Bhatta, A., Yao, L., Xu, Z., Toque, H. A., Chen, J., Atawia, R. T., Fouda, A. Y., Bagi, Z., Lucas, R., Caldwell, R. B., & Caldwell, R. W. (2017). Obesity-induced vascular dysfunction and arterial stiffening requires endothelial cell arginase 1. *Cardiovasc Res*, 113(13), 1664-1676. doi:10.1093/cvr/cvx164
- Boucher, J., Masri, B., Daviaud, D., Gesta, S., Guigne, C., Mazzucotelli, A., Castan-Laurell, I., Tack, I., Knibiehler, B., Carpenne, C., Audigier, Y., Saulnier-Blache, J. S., & Valet, P. (2005). Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology*, 146(4), 1764-1771. doi:10.1210/en.2004-1427
- Canto, C., & Auwerx, J. (2009). PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol*, 20(2), 98-105. doi:10.1097/MOL.0b013e328328d0a4
- Carpenne, C., Dray, C., Attane, C., Valet, P., Portillo, M. P., Churrua, I., Milagro, F. I., & Castan-Laurell, I. (2007). Expanding role for the apelin/APJ system in physiopathology. *J Physiol Biochem*, 63(4),

- Castan-Laurell, I., Dray, C., Attane, C., Duparc, T., Knauf, C., & Valet, P. (2011). Apelin, diabetes, and obesity. *Endocrine*, 40(1), 1-9. doi:10.1007/s12020-011-9507-9
- Castan-Laurell, I., Dray, C., Knauf, C., Kunduzova, O., & Valet, P. (2012). Apelin, a promising target for type 2 diabetes treatment? *Trends Endocrinol Metab*, 23(5), 234-241. doi:10.1016/j.tem.2012.02.005
- Catoire, M., Mensink, M., Boekschoten, M. V., Hangelbroek, R., Muller, M., Schrauwen, P., & Kersten, S. (2012). Pronounced effects of acute endurance exercise on gene expression in resting and exercising human skeletal muscle. *PLoS One*, 7(11), e51066. doi:10.1371/journal.pone.0051066
- Chen, J., Wong, H. S., Leong, P. K., Leung, H. Y., Chan, W. M., & Ko, K. M. (2017). Ursolic acid induces mitochondrial biogenesis through the activation of AMPK and PGC-1 in C2C12 myotubes: a possible mechanism underlying its beneficial effect on exercise endurance. *Food Funct*, 8(7), 2425-2436. doi:10.1039/c7fo00127d
- Choo, H. J., Kim, J. H., Kwon, O. B., Lee, C. S., Mun, J. Y., Han, S. S., Yoon, Y. S., Yoon, G., Choi, K. M., & Ko, Y. G. (2006). Mitochondria are impaired in the adipocytes of type 2 diabetic mice. *Diabetologia*, 49(4), 784-791. doi:10.1007/s00125-006-0170-2
- Coen, P. M., Jubrias, S. A., Distefano, G., Amati, F., Mackey, D. C., Glynn, N. W., Manini, T. M., Wohlgemuth, S. E., Leeuwenburgh, C., Cummings, S. R., Newman, A. B., Ferrucci, L., Toledo, F. G., Shankland, E., Conley, K. E., & Goodpaster, B. H. (2013). Skeletal muscle mitochondrial energetics are associated with maximal aerobic capacity and walking speed in older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 68(4), 447-455. doi:10.1093/gerona/gls196
- Collins, K. H., Hart, D. A., Smith, I. C., Issler, A. M., Reimer, R. A., Seerattan, R. A., Rios, J. L., & Herzog, W. (2017). Acute and chronic changes in rat soleus muscle after high-fat high-sucrose diet. *Physiol Rep*, 5(10). doi:10.14814/phy2.13270
- Cong, F., Wei, Y. L., & Ji, X. L. (2015). [Apelin/APJ system--the important targets for the regulation of energy metabolism]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*, 46(1), 49-51.
- Cooke, A. A., Connaughton, R. M., Lyons, C. L., McMorrow, A. M., & Roche, H. M. (2016). Fatty acids and chronic low grade inflammation associated with obesity and the metabolic syndrome. *Eur J Pharmacol*, 785, 207-214. doi:10.1016/j.ejphar.2016.04.021
- Daviaud, D., Boucher, J., Gesta, S., Dray, C., Guigne, C., Quilliot, D., Ayav, A., Ziegler, O., Carpene, C., Saulnier-Blache, J. S., Valet, P., & Castan-Laurell, I. (2006). TNFalpha up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue. *FASEB J*, 20(9), 1528-1530. doi:10.1096/fj.05-5243fje
- Dray, C., Debard, C., Jager, J., Disse, E., Daviaud, D., Martin, P., Attane, C., Wanecq, E., Guigne, C., Bost, F., Tanti, J. F., Laville, M., Vidal, H., Valet, P., & Castan-Laurell, I. (2010). Apelin and APJ regulation in adipose tissue and skeletal muscle of type 2 diabetic mice and

- humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298(6), E1161-1169. doi:10.1152/ajpendo.00598.2009
- Dray, C., Knauf, C., Daviaud, D., Waget, A., Boucher, J., Buleon, M., Cani, P. D., Attane, C., Guigne, C., Carpene, C., Burcelin, R., Castan-Laurell, I., & Valet, P. (2008). Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab*, 8(5), 437-445. doi:10.1016/j.cmet.2008.10.003
- Eckel, R. H., Grundy, S. M., & Zimmet, P. Z. (2005). The metabolic syndrome. *Lancet*, 365(9468), 1415-1428. doi:10.1016/S0140-6736(05)66378-7
- Ferran, B., Marti-Pamies, I., Alonso, J., Rodriguez-Calvo, R., Aguilo, S., Vidal, F., Rodriguez, C., & Martinez-Gonzalez, J. (2016). The nuclear receptor NOR-1 regulates the small muscle protein, X-linked (SMPX) and myotube differentiation. *Scientific Reports*, 6. doi:ARTN 25944 10.1038/srep25944
- Ferretti, R., Moura, E. G., Dos Santos, V. C., Caldeira, E. J., Conte, M., Matsumura, C. Y., Pertille, A., & Mosqueira, M. (2018). High-fat diet suppresses the positive effect of creatine supplementation on skeletal muscle function by reducing protein expression of IGF-PI3K-AKT-mTOR pathway. *PLoS One*, 13(10), e0199728. doi:10.1371/journal.pone.0199728
- Fillmore, N., Jacobs, D. L., Mills, D. B., Winder, W. W., & Hancock, C. R. (2010). Chronic AMP-activated protein kinase activation and a high-fat diet have an additive effect on mitochondria in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985), 109(2), 511-520. doi:10.1152/japplphysiol.00126.2010
- Fischer, F., Hamann, A., & Osiewacz, H. D. (2012). Mitochondrial quality control: an integrated network of pathways. *Trends Biochem Sci*, 37(7), 284-292. doi:10.1016/j.tibs.2012.02.004
- Fraulob, J. C., Ogg-Diamantino, R., Fernandes-Santos, C., Aguila, M. B., & Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2010). A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *J Clin Biochem Nutr*, 46(3), 212-223. doi:10.3164/jcbn.09-83
- Fu, Y., Luo, L., Luo, N., Zhu, X., & Garvey, W. T. (2007). NR4A orphan nuclear receptors modulate insulin action and the glucose transport system: potential role in insulin resistance. *J Biol Chem*, 282(43), 31525-31533. doi:10.1074/jbc.M701132200
- Golpich, M., Amini, E., Mohamed, Z., Azman Ali, R., Mohamed Ibrahim, N., & Ahmadiani, A. (2017). Mitochondrial Dysfunction and Biogenesis in Neurodegenerative diseases: Pathogenesis and Treatment. *CNS Neurosci Ther*, 23(1), 5-22. doi:10.1111/cns.12655
- Goncalves, N. G., Cavaletti, S. H., Pasqualucci, C. A., Martins, M. A., & Lin, C. J. (2017). Fructose ingestion impairs expression of genes involved in skeletal muscle's adaptive response to aerobic exercise. *Genes and Nutrition*, 12. doi:ARTN 33 10.1186/s12263-017-0588-9

- Goode, J. M., Pearen, M. A., Tuong, Z. K., Wang, S. C., Oh, T. G., Shao, E. X., & Muscat, G. E. (2016). The Nuclear Receptor, Nor-1, Induces the Physiological Responses Associated With Exercise. *Mol Endocrinol*, 30(6), 660–676. doi:10.1210/me.2015-1300
- Greenbaum, D., Colangelo, C., Williams, K., & Gerstein, M. (2003). Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol*, 4(9), 117. doi:10.1186/gb-2003-4-9-117
- Grundy, S. M. (2005). A constellation of complications: the metabolic syndrome. *Clin Cornerstone*, 7(2-3), 36–45.
- Grundy, S. M., Cleeman, J. I., Daniels, S. R., Donato, K. A., Eckel, R. H., Franklin, B. A., Gordon, D. J., Krauss, R. M., Savage, P. J., Smith, S. C., Jr., Spertus, J. A., & Fernando, C. (2005). Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement: Executive Summary. *Crit Pathw Cardiol*, 4(4), 198–203.
- Guo, J., Jou, W., Gavrilova, O., & Hall, K. D. (2009). Persistent diet-induced obesity in male C57BL/6 mice resulting from temporary obesigenic diets. *PLoS One*, 4(4), e5370. doi:10.1371/journal.pone.0005370
- Hancock, C. R., Han, D. H., Chen, M., Terada, S., Yasuda, T., Wright, D. C., & Holloszy, J. O. (2008). High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(22), 7815–7820. doi:10.1073/pnas.0802057105
- Held, N. M., & Houtkooper, R. H. (2015). Mitochondrial quality control pathways as determinants of metabolic health. *Bioessays*, 37(8), 867–876. doi:10.1002/bies.201500013
- Herzig, S., & Shaw, R. J. (2018). AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(2), 121–135. doi:10.1038/nrm.2017.95
- Hesselink, M. K., Schrauwen-Hinderling, V., & Schrauwen, P. (2016). Skeletal muscle mitochondria as a target to prevent or treat type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*, 12(11), 633–645. doi:10.1038/nrendo.2016.104
- Holmstrom, M. H., Iglesias-Gutierrez, E., Zierath, J. R., & Garcia-Roves, P. M. (2012). Tissue-specific control of mitochondrial respiration in obesity-related insulin resistance and diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 302(6), E731–739. doi:10.1152/ajpendo.00159.2011
- Huh, J. H., Kang, D. R., Jang, J. Y., Shin, J. H., Kim, J. Y., Choi, S., Cho, E. J., Park, J. S., Sohn, I. S., Jo, S. H., Sung, K. C., & Koh, K. K. (2018). Metabolic syndrome epidemic among Korean adults: Korean survey of Cardiometabolic Syndrome (2018). *Atherosclerosis*, 277, 47–52. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2018.08.003
- Huh, J. H., Yadav, D., Kim, J. S., Son, J. W., Choi, E., Kim, S. H., Shin, C., Sung, K. C., & Kim, J. Y. (2017). An association of metabolic syndrome and chronic kidney disease from a 10-year prospective cohort study. *Metabolism*, 67, 54–61. doi:10.1016/j.metabol.2016.11.003

- Jager, S., Handschin, C., St-Pierre, J., & Spiegelman, B. M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(29), 12017–12022. doi:10.1073/pnas.0705070104
- Jain, S. S., Pagliarunga, S., Vigna, C., Ludzki, A., Herbst, E. A., Lally, J. S., Schrauwen, P., Hoeks, J., Tupling, A. R., Bonen, A., & Holloway, G. P. (2014). High-fat diet-induced mitochondrial biogenesis is regulated by mitochondrial-derived reactive oxygen species activation of CaMKII. *Diabetes*, 63(6), 1907–1913. doi:10.2337/db13-0816
- Kanzleiter, T., Wilks, D., Preston, E., Ye, J., Frangioudakis, G., & Cooney, G. J. (2009). Regulation of the nuclear hormone receptor nur77 in muscle: influence of exercise-activated pathways in vitro and obesity in vivo. *Biochim Biophys Acta*, 1792(8), 777–782. doi:10.1016/j.bbadis.2009.05.002
- Karbek, B., Bozkurt, N. C., Topaloglu, O., Aslan, M. S., Gungunes, A., Cakal, E., & Delibasi, T. (2014). Relationship of vaspin and apelin levels with insulin resistance and atherosclerosis in metabolic syndrome. *Minerva Endocrinol*, 39(2), 99–105.
- Kawasaki, E., Hokari, F., Sasaki, M., Sakai, A., Koshinaka, K., & Kawanaka, K. (2009). Role of local muscle contractile activity in the exercise-induced increase in NR4A receptor mRNA expression. *J Appl Physiol* (1985), 106(6), 1826–1831. doi:10.1152/japplphysiol.90923.2008
- Kawasaki, E., Hokari, F., Sasaki, M., Sakai, A., Koshinaka, K., & Kawanaka, K. (2011). The effects of beta-adrenergic stimulation and exercise on NR4A3 protein expression in rat skeletal muscle. *J Physiol Sci*, 61(1), 1–11. doi:10.1007/s12576-010-0114-y
- Kim, J. Y., Nolte, L. A., Hansen, P. A., Han, D. H., Ferguson, K., Thompson, P. A., & Holloszy, J. O. (2000). High-fat diet-induced muscle insulin resistance: relationship to visceral fat mass. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279(6), R2057–2065. doi:10.1152/ajpregu.2000.279.6.R2057
- Krist, J., Wieder, K., Kloting, N., Oberbach, A., Kralisch, S., Wiesner, T., Schon, M. R., Gartner, D., Dietrich, A., Shang, E., Lohmann, T., Dressler, M., Fasshauer, M., Stumvoll, M., & Bluher, M. (2013). Effects of weight loss and exercise on apelin serum concentrations and adipose tissue expression in human obesity. *Obes Facts*, 6(1), 57–69. doi:10.1159/000348667
- Li, L., Muhlfeld, C., Niemann, B., Pan, R., Li, R., Hilfiker-Kleiner, D., Chen, Y., & Rohrbach, S. (2011). Mitochondrial biogenesis and PGC-1 α deacetylation by chronic treadmill exercise: differential response in cardiac and skeletal muscle. *Basic Res Cardiol*, 106(6), 1221–1234. doi:10.1007/s00395-011-0213-9
- Liu, Q., Zhu, X., Xu, L., Fu, Y., & Garvey, W. T. (2013). 6-Mercaptopurine augments glucose transport activity in skeletal muscle cells in part via a mechanism dependent upon orphan nuclear receptor NR4A3. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 305(9), E1081–1092. doi:10.1152/ajpendo.00169.2013
- Liu, Y., Yuan, J., Xiang, L., Zhao, Y., Niu, M., Dai, X., & Chen, H. (2017). A

- high sucrose and high fat diet induced the development of insulin resistance in the skeletal muscle of Bama miniature pigs through the Akt/GLUT4 pathway. *Exp Anim*, 66(4), 387–395. doi:10.1538/expanim.17-0010
- Lundby, C., & Jacobs, R. A. (2016). Adaptations of skeletal muscle mitochondria to exercise training. *Exp Physiol*, 101(1), 17–22. doi:10.1113/EP085319
- Magliano, D. J., Shaw, J. E., & Zimmet, P. Z. (2006). How to best define the metabolic syndrome. *Annals of Medicine*, 38(1), 34–41. doi:10.1080/07853890500300311
- Mahoney, D. J., Parise, G., Melov, S., Safdar, A., & Tarnopolsky, M. A. (2005). Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. *FASEB J*, 19(11), 1498–1500. doi:10.1096/fj.04-3149fje
- Marchesini, G., Bugianesi, E., Forlani, G., Cerrelli, F., Lenzi, M., Manini, R., Natale, S., Vanni, E., Villanova, N., Melchionda, N., & Rizzetto, M. (2003). Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology*, 37(4), 917–923. doi:10.1053/jhep.2003.50161
- Marin, T. L., Gongol, B., Zhang, F., Martin, M., Johnson, D. A., Xiao, H., Wang, Y., Subramaniam, S., Chien, S., & Shyy, J. Y. (2017). AMPK promotes mitochondrial biogenesis and function by phosphorylating the epigenetic factors DNMT1, RBBP7, and HAT1. *Sci Signal*, 10(464). doi:10.1126/scisignal.aaf7478
- Martins, A. R., Crisma, A. R., Masi, L. N., Amaral, C. L., Marzuca-Nassr, G. N., Bomfim, L. H. M., Teodoro, B. G., Queiroz, A. L., Serdan, T. D. A., Torres, R. P., Mancini-Filho, J., Rodrigues, A. C., Alba-Loureiro, T. C., Pithon-Curi, T. C., Gorjao, R., Silveira, L. R., Curi, R., Newsholme, P., & Hirabara, S. M. (2018). Attenuation of obesity and insulin resistance by fish oil supplementation is associated with improved skeletal muscle mitochondrial function in mice fed a high-fat diet. *J Nutr Biochem*, 55, 76–88. doi:10.1016/j.jnutbio.2017.11.012
- Mendrick, D. L., Diehl, A. M., Topor, L. S., Dietert, R. R., Will, Y., La Merrill, M. A., Bouret, S., Varma, V., Hastings, K. L., Schug, T. T., Emeigh Hart, S. G., & Burleson, F. G. (2018). Metabolic Syndrome and Associated Diseases: From the Bench to the Clinic. *Toxicol Sci*, 162(1), 36–42. doi:10.1093/toxsci/kfx233
- Menke, A., Casagrande, S., Geiss, L., & Cowie, C. C. (2015). Prevalence of and Trends in Diabetes Among Adults in the United States, 1988–2012. *JAMA*, 314(10), 1021–1029. doi:10.1001/jama.2015.10029
- Mey, J. T., Solomon, T. P. J., Kirwan, J. P., & Haus, J. M. (2019). Skeletal muscle Nur77 and NOR1 insulin responsiveness is blunted in obesity and type 2 diabetes but improved after exercise training. *Physiol Rep*, 7(6), e14042. doi:10.14814/phy2.14042
- Noori-Zadeh, A., Bakhtiyari, S., Khanjari, S., Haghani, K., & Darabi, S. (2019). Elevated blood apelin levels in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract*, 148, 43–53. doi:10.1016/j.diabres.2018.12.012

- Orozco, L. J., Buchleitner, A. M., Gimenez-Perez, G., Roque, I. F. M., Richter, B., & Mauricio, D. (2008). Exercise or exercise and diet for preventing type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev*(3), CD003054. doi:10.1002/14651858.CD003054.pub3
- Panchal, S. K., Poudyal, H., Iyer, A., Nazer, R., Alam, A., Diwan, V., Kauter, K., Sernia, C., Campbell, F., Ward, L., Gobe, G., Fenning, A., & Brown, L. (2011). High-carbohydrate high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 57(1), 51-64. doi:10.1097/FJC.0b013e3181feb90a
- Pattamaprapanont, P., Garde, C., Fabre, O., & Barres, R. (2016). Muscle Contraction Induces Acute Hydroxymethylation of the Exercise-Responsive Gene Nr4a3. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 7, 165. doi:10.3389/fendo.2016.00165
- Pearen, M. A., Eriksson, N. A., Fitzsimmons, R. L., Goode, J. M., Martel, N., Andrikopoulos, S., & Muscat, G. E. (2012). The nuclear receptor, Nor-1, markedly increases type II oxidative muscle fibers and resistance to fatigue. *Mol Endocrinol*, 26(3), 372-384. doi:10.1210/me.2011-1274
- Pearen, M. A., & Muscat, G. E. (2010). Minireview: Nuclear hormone receptor 4A signaling: implications for metabolic disease. *Mol Endocrinol*, 24(10), 1891-1903. doi:10.1210/me.2010-0015
- Pearen, M. A., & Muscat, G. E. (2012). Orphan nuclear receptors and the regulation of nutrient metabolism: understanding obesity. *Physiology (Bethesda)*, 27(3), 156-166. doi:10.1152/physiol.00007.2012
- Pearen, M. A., & Muscat, G. E. O. (2018). The Nuclear Receptor Nor-1 Is a Pleiotropic Regulator of Exercise-Induced Adaptations. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 46(2), 97-104. doi:10.1249/Jes.0000000000000143
- Pearen, M. A., Myers, S. A., Raichur, S., Ryall, J. G., Lynch, G. S., & Muscat, G. E. (2008). The orphan nuclear receptor, NOR-1, a target of beta-adrenergic signaling, regulates gene expression that controls oxidative metabolism in skeletal muscle. *Endocrinology*, 149(6), 2853-2865. doi:10.1210/en.2007-1202
- Pearen, M. A., Ryall, J. G., Maxwell, M. A., Ohkura, N., Lynch, G. S., & Muscat, G. E. (2006). The orphan nuclear receptor, NOR-1, is a target of beta-adrenergic signaling in skeletal muscle. *Endocrinology*, 147(11), 5217-5227. doi:10.1210/en.2006-0447
- Petersen, K. F., Dufour, S., Befroy, D., Garcia, R., & Shulman, G. I. (2004). Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*, 350(7), 664-671. doi:10.1056/NEJMoa031314
- Ranhotra, H. S. (2015). The NR4A orphan nuclear receptors: mediators in metabolism and diseases. *J Recept Signal Transduct Res*, 35(2), 184-188. doi:10.3109/10799893.2014.948555
- Ren, J., Pulakat, L., Whaley-Connell, A., & Sowers, J. R. (2010). Mitochondrial biogenesis in the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *J Mol Med (Berl)*, 88(10), 993-1001.

doi:10.1007/s00109-010-0663-9

- Rozendaal, Y. J. W., Wang, Y., Hilbers, P. A. J., & van Riel, N. A. W. (2019). Computational modelling of energy balance in individuals with Metabolic Syndrome. *BMC Syst Biol*, *13*(1), 24. doi:10.1186/s12918-019-0705-z
- Scarpulla, R. C., Vega, R. B., & Kelly, D. P. (2012). Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends Endocrinol Metab*, *23*(9), 459–466. doi:10.1016/j.tem.2012.06.006
- Schreyer, S. A., Wilson, D. L., & LeBoeuf, R. C. (1998). C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis*, *136*(1), 17–24.
- Sher, J., & Cardasis, C. (1976). Skeletal muscle fiber types in the adult mouse. *Acta Neurol Scand*, *54*(1), 45–56.
- Smith, C. J., Kener, K. B., & Tessem, J. S. (2018). Nr4a1 and Nr4a3 Knock Out Mice Have Impaired Glucose Clearance and Beta-Cell Function under High-Fat Feeding. *Diabetes*, *67*. doi:10.2337/db18-2040-P
- Son, J. S., Kim, H. J., Son, Y., Lee, H., Chae, S. A., Seong, J. K., & Song, W. (2017). Effects of exercise-induced apelin levels on skeletal muscle and their capillarization in type 2 diabetic rats. *Muscle Nerve*, *56*(6), 1155–1163. doi:10.1002/mus.25596
- Sparks, L. M., Xie, H., Koza, R. A., Mynatt, R., Hulver, M. W., Bray, G. A., & Smith, S. R. (2005). A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes*, *54*(7), 1926–1933. doi:10.2337/diabetes.54.7.1926
- Srisawat, K., Shepherd, S. O., Lisboa, P. J., & Burniston, J. G. (2017). A Systematic Review and Meta-Analysis of Proteomics Literature on the Response of Human Skeletal Muscle to Obesity/Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) Versus Exercise Training. *Proteomes*, *5*(4). doi:10.3390/proteomes5040030
- Staron, R. S., Kraemer, W. J., Hikida, R. S., Fry, A. C., Murray, J. D., & Campos, G. E. (1999). Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. *Histochem Cell Biol*, *111*(2), 117–123.
- Vina, J., Gomez-Cabrera, M. C., Borrás, C., Froio, T., Sanchis-Gomar, F., Martínez-Bello, V. E., & Pallardo, F. V. (2009). Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing. *Adv Drug Deliv Rev*, *61*(14), 1369–1374. doi:10.1016/j.addr.2009.06.006
- Vinel, C., Lukjanenko, L., Batut, A., Deleruyelle, S., Pradere, J. P., Le Gonidec, S., Dortignac, A., Geoffre, N., Pereira, O., Karaz, S., Lee, U., Camus, M., Chaoui, K., Mouisel, E., Bigot, A., Mouly, V., Vigneau, M., Pagano, A. F., Chopard, A., Pillard, F., Guyonnet, S., Cesari, M., Burlet-Schiltz, O., Pahor, M., Feige, J. N., Vellas, B., Valet, P., & Dray, C. (2018). The exerkin apelin reverses age-associated sarcopenia. *Nat Med*, *24*(9), 1360–1371. doi:10.1038/s41591-018-0131-6
- Wisloff, U., Najjar, S. M., Ellingsen, O., Haram, P. M., Swoap, S., Al-Share, Q., Fernstrom, M., Rezaei, K., Lee, S. J., Koch, L. G., & Britton, S. L.

- (2005). Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. *Science*, 307(5708), 418-420. doi:10.1126/science.1108177
- Wong, S. K., Chin, K. Y., Suhaimi, F. H., Fairus, A., & Ima-Nirwana, S. (2016). Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutr Metab (Lond)*, 13, 65. doi:10.1186/s12986-016-0123-9
- Wu, X., Wang, J., Cui, X., Maianu, L., Rhees, B., Rosinski, J., So, W. V., Willi, S. M., Osier, M. V., Hill, H. S., Page, G. P., Allison, D. B., Martin, M., & Garvey, W. T. (2007). The effect of insulin on expression of genes and biochemical pathways in human skeletal muscle. *Endocrine*, 31(1), 5-17.
- Xu, H., Zhou, Y., Liu, Y., Ping, J., Shou, Q., Chen, F., & Ruo, R. (2016). Metformin improves hepatic IRS2/PI3K/Akt signaling in insulin-resistant rats of NASH and cirrhosis. *J Endocrinol*, 229(2), 133-144. doi:10.1530/JOE-15-0409
- Yang, Z. H., Miyahara, H., Takeo, J., & Katayama, M. (2012). Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of genes involved in lipogenesis, insulin signalling and inflammation in mice. *Diabetol Metab Syndr*, 4(1), 32. doi:10.1186/1758-5996-4-32
- Yki-Jarvinen, H. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2(11), 901-910. doi:10.1016/S2213-8587(14)70032-4
- Zhu, S., Sun, F., Li, W., Cao, Y., Wang, C., Wang, Y., Liang, D., Zhang, R., Zhang, S., Wang, H., & Cao, F. (2011). Apelin stimulates glucose uptake through the PI3K/Akt pathway and improves insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biochem*, 353(1-2), 305-313. doi:10.1007/s11010-011-0799-0
- Zhu, X., Walton, R. G., Tian, L., Luo, N., Ho, S. R., Fu, Y., & Garvey, W. T. (2013). Prostaglandin A2 enhances cellular insulin sensitivity via a mechanism that involves the orphan nuclear receptor NR4A3. *Horm Metab Res*, 45(3), 213-220. doi:10.1055/s-0032-1327619

Abstract

The Effect of Aerobic Exercise and High fat, High sugar Restriction on the Expression of Nr4a3, Apelin and Improvement of Metabolic Indicators

Jihyun Lee

Health and Exercise Science

Department of Physical Education

The Graduate School

Seoul National University

Introduction: Recently metabolic syndrome is increasing rapidly. The Metabolic syndrome is a complex disease that causes various associated diseases, and a growing number of people are suffering from this disease in worldwide. Exercise is emerging as a way to treat metabolic syndrome but underlying mechanism related with metabolic syndrome is not well understood. In addition, as a molecule that can mediate the beneficial effects of the exercise against the metabolism, The Nr4a3 and Apelin, are reported to play a role in metabolic diseases such as obesity and type 2 diabetes. The purpose of this study is to compare the level of expression of two molecules, Nr4a3 and Apelin, according to the group after the treatment of exercise and dietary restriction. Also the metabolic indicator associated with metabolic disorder

(Bodyweight, GTT, serum TC, TG) and mitochondrial function related molecular markers were analyzed according to exercise and diet intervention.

Method: 4 Weeks old male C57BL/6 mouse were provided high fat and high sucrose diet for 8 weeks to induce metabolically abnormal, obese condition. After that, 8 weeks of exercise and dietary restriction were treated. The mouse were divided into 8 following groups: Control group (CON), Control + exercise group (CONEX), Sucrose restriction group (SR), Sucrose restriction + exercise group (SREX), High fat and high sucrose group (HFHS), High fat and high sucrose + exercise group (HFHSEX), Normal diet (ND) and Normal diet and exercise group (NDEX). To confirm the metabolically abnormal condition, body weight, glucose tolerance, serum total cholesterol, triglyceride and pAKT/AKT were measured. After the gastrocnemius muscle wet weight was measured and the Nr4a3, apelin and mitochondrial function related molecular marker (pAKT/AKT, pAMPK/AMPK, PGC1alpha, SDHA) expression were detected using western blot, real-time PCR. Serum and muscle apelin level were analyzed by ELISA method. The data were analyzed using Graph Pad Prism 7 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA, USA) and SPSS Version 23 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) software. The results were presented as mean \pm standard error of mean and data were analyzed using one-way ANOVA to compare the differences among the groups and independent t-test between two groups. The Interaction of dietary and exercise intervention effect on each molecule were analyzes using two-way ANOVA. The statistical significance level was set at $p < 0.05$.

Result: The metabolic abnormalities was induced after the supply of 8 weeks of high fat and high sucrose. As a result of IPGTT, ND and NDEX groups compared to HFHS were significantly lowered glucose level in the blood over time. Blood TC and TG concentrations also showed significantly higher levels in HFHS group compared to control group, which represents metabolic disorder. The ratio of pAKT/AKT related to insulin signaling pathway was significantly increased in the ND group compared to the HFHS group. For the protein level of Nr4a3, the HFHSEX group observed an significant increase compared to HFHS group, indicating the effects of exercise. Serum Apelin level was reduced in the group of HFHS and ND after the exercise treatment. No significant changes in the level of muscle Apelin expression level. The pAMPK/AMPK ratio which is associated with mitochondrial function, was increased in CONEX group compared with CON group and 8 weeks of sucrose restriction lowered the level of pAMPK/AMPK ratio to the control level. The PGC1alpha expression was decreased significantly after the sucrose restriction compared to HFHS group. Also, the exercise effect was shown in the group of HFHSEX compared to HFHS group.

Conclusion: Based on the above results, high fat and high sugar diets caused metabolic abnormalities. 8 weeks of sugar restrictions, sugar and fat restrictions, and exercise intervention could be possible contributors to the improvement of metabolic indicators, improvement of muscle function and an increase in the level of pAKT/AKT. Also, Exercise can increase the expression of Nr4a3 in high fat and high sugar induced obesity and decrease the level of serum apelin which was increased in obese condition. In addition,

sugar restriction can affect levels of pAMPK/AMPK and PGC1alpha which are related to mitochondrial function, and exercise can also play a role in improving mitochondrial oxidative capacity by improving SDHA levels. Therefore, there is need for further studies performed by applying various intervention periods and exercise methods to determine the specific role of molecules changed by exercise and dietary restriction treatment in metabolic diseases especially in mitochondrial function, lipids, carbohydrate metabolism etc.

Keywords : Metabolic syndrome, Nr4a3, Apelin, Mitochondrial function, Exercise, Diet restriction.

Student Number : 2017–23613